

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Magda Sindičić dr.med.vet.

Genska raznolikost populacije risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske

Doktorski rad

Zagreb, 2011. godine

Doktorski rad je izrađen na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Alena Slavice dr. med. vet.

Izrada doktorskog rada financirana je iz sljedećih izvora:

- projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH „Zdravstveni nadzor divljači“ (053-0532400-2398), voditelj prof. dr. sc. Alen Slavica.
- Državni zavod za zaštitu prirode putem ugovora s Veterinarskim fakultetom za izradu „Studije o potrebi unošenja pojedinih jedinki risa na područje rasprostranjenosti risa u Hrvatskoj“, voditelj Magda Sindičić dr. med. vet.
- Carlsberg Hrvatska, Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH i Agencija za zaštitu okoliša putem programa „Zelena stipendija“, kojim je financiran projekt „Istraživanje genskih osobitosti euroazijskoga risa (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj“, voditelj Magda Sindičić dr. med. vet.
- Europska komisija putem Interreg IIIA projekta „Prekogranična suradnja u upravljanju, zaštiti i istraživanju dinarske populacije risa“, voditelj prof. dr. sc. Đuro Huber.
- Ministarstvo za visoko obrazovanje, znanost i tehnologiju Republike Slovenije putem stipendije Magdi Sindičić dr. med. vet. za boravak na Biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija.

Zahvaljujem dr. sc. Tomislavu Gomerčiću koji je bio uz mene na svakom koraku izrade disertacije, te mi je bio velika znanstvena i prijateljska podrška. Zahvaljujem prof. dr. sc. Alenu Slavici koji me izabrao za svog novaka, podržao pri izboru teme disertacije i izuzetno pomogao oko birokratskih zavrzlama. Zahvaljujem prof. dr. sc. Đuri Huberu koji je bio moj mentor od prvih godina fakulteta i uveo me u predivan svijet velikih zvijeri.

Zahvaljujem Maji Jelenčić, Primožu Polancu i Tomažu Skrbinšku s Biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani na neprocjenjivoj pomoći prilikom genotipizacije. Zahvaljujem kolegama Josipu Kusaku, Vedranu Slijepčeviću i Josipu Tomaiću na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka.

Zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na ljubavi i podršci, te prijateljicama Juliji i Aneri koje su moja obitelj u Zagrebu.

Sadržaj

1. Uvod	6
2. Pregled literature	9
2.1 Sistematika i evolucija euroazijskog risa	10
2.2 Rasprostranjenost euroazijskog risa	11
2.3 Biologija euroazijskog risa	14
2.4 Povijest upravljanja euroazijskim risom u Europi i Hrvatskoj	18
2.5 Metode molekularne genetike u istraživanjima populacija	22
2.6 Genska raznolikost	23
2.7 „Usko grlo“ (engl. bottleneck)	26
2.8 Depresija zbog parenja u srodstvu	27
2.9 Kontrolna regija mitohondrijske DNA	29
2.10 Mikrosatelitski lokusi	31
2.11 Molekularno određivanje spola	35
2.12 Dosadašnja molekularno genetska istraživanja euroazijskog risa	35
3. Materijali i metode	39
3.1 Sakupljanje uzoraka	40
3.2 Izolacija DNA	50
3.3 Kontrolna regija mtDNA	53
3.3.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	53
3.3.2 Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu.....	54
3.3.3 Sekvenciranje kontrolne regije mtDNA.....	55
3.3.4 Analiza rezultata sekvenciranja.....	55
3.3.5 Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu.....	55
3.3.6 Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka.....	55
3.3.7 Prikaz odnosa između haplotipova.....	56
3.4 Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa	56
3.4.1 Optimizacija lančane reakcije polimerazom.....	58
3.4.2 Lančana reakcija polimerazom.....	60
3.4.3 Genotipizacija.....	65
3.5 Statistička analiza genotipova	66

3.5.1	Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže.....	66
3.5.2	Vjerojatnost ident. jedinke upotrebom mikrosatelitskih lokusa.....	67
3.5.3	Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck).....	67
3.5.4	Procjena postojanja subpopulacija.....	68
4.	Rezultati.....	69
4.1	Izolacija DNA.....	70
4.2	Kontrolna regija mitohondrijske DNA.....	71
4.2.1	Uspješnost umnažanja i sekvenciranja kontrolne regije.....	71
4.2.2	Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu.....	72
4.2.3	Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA.....	73
4.2.4	Raznolikost sljedova kontrolne regije.....	74
4.2.5	Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovimapreuzetim iz GenBank baze podataka.....	77
4.3	Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa.....	80
4.3.1	Uspješnost genotipizacije mikrosatelitskih lokusa.....	80
4.3.2	Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke.....	82
4.3.3	Vjerojatnost identifikacije jedinke upotrebom mikrosatelitskih lokusa...	94
4.3.4	Procjena "uskog grla" (engl. bootleneck).....	95
4.3.5	Procjena postojanja subpopulacija.....	97
4.4.	Određivanje spola.....	100
5.	Rasprava.....	101
5.1	Uspješnost sekvenciranja kontrolne regije i genotipizacije uzoraka.....	102
5.2	Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu.....	103
5.3	Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA.....	104
5.4	Ponavljajuću sekvenca unutar kontrolne regije.....	105
5.5	Genska raznolikost euroazijskog risa iz Hrvatske.....	106
5.6	Usporedba s ostalim vrstama.....	111
6.	Zaključci.....	114
7.	Literatura.....	117
8.	Sažetak.....	137
9.	Summary.....	139
10.	Životopis.....	141

1. Uvod

Najvažniji cilj konzervacijske genetike je utvrditi povezanost između genske raznolikosti i sposobnosti preživljavanja populacija (FRANKHAM i sur., 2002.). Da bi to postigli istražuju se uzroci i utjecaj genske raznolikosti, što bi u idealnim uvjetima uključivalo podatke o svim aspektima genske raznolikosti, uključujući kvantitativnu raznolikost obilježja koji su pod utjecajem evolucijskog pritiska, molekularnu raznolikost ključnih funkcionalnih lokusa, te raznolikost kodirajućih i nekodirajućih lokusa diljem genoma (REED i FRANKHAM, 2003.). No zbog ograničenih mogućnosti istraživanja, najnovija istraživanja genske raznolikosti se prvenstveno temelje na mitohondrijskoj DNA i mikrosatelitima, markerima koji su korišteni i u ovom istraživanju genske raznolikosti euroazijskog risa iz Hrvatske.

Euroazijski ris (*Lynx lynx*) jedan je od najugroženijih sisavaca Hrvatske, zaštićen temeljem Zakona o zaštiti prirode (NN 70/05) i Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 7/06), te mnogim međunarodnim ugovorima i konvencijama (Konvencija o biološkoj raznolikosti, Bernska konvencija, CITES, itd.). Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2010. do 2015. godine (SINDIČIĆ i sur., 2010b.) navodi da današnju populaciju euroazijskog risa u Hrvatskoj čini najviše 40 do 60 životinja, što je rezultat pada brojnosti u posljednjih desetak godina. Ris je već jednom potpuno nestao iz Hrvatske, kada je 1903. godine odstrijeljena posljednja jedinka iz autohtone populacije (KORITNIK, 1974.). Populacija je ponovno uspostavljena 1973. godine, reintrodukcijom 6 jedinki iz Slovačke u Sloveniju (FRKOVIĆ, 1998.), odakle se ris proširio preko Hrvatske do Bosne i Hercegovine, no populacija je danas opet dovedena pred sam rub opstanka.

Uz krivolov, fragmentaciju staništa i nedostatak plijena, kao jedan od najvažnijih uzroka pada brojnosti smatra se gubitak genske raznolikosti, nastao kao posljedica parenja u srodstvu. Naime, značajan činilac dinamike populacije risa u Hrvatskoj jest činjenica da su sve jedinke u posljednjih 37 godina (od reintrodukcije 1973.) potomci samo tri naseljene ženke, za koje se smatra da su također bile u srodstvu. U tom razdoblju nastalo je maksimalno 18 generacija, kod kojih je parenje u srodstvu moralo dovesti do velikog gubitka genske raznolikosti, s mogućim posljedičnim padom sposobnosti preživljavanja. Naime, populacija s tako niskim brojem i osiromašenom genskom raznolikošću vrlo je osjetljiva na sve okolišne čimbenike i smanjena joj je sposobnost prilagodbe promjenama u okolišu (kao što su klimatske promjene, unos novih parazita, prilagodba na novi način prehrane, itd.) odnosno izgubila je svoj evolucijski potencijal.

Preliminarnim istraživanjima genska osiromašenost hrvatske populacije euroazijskog risa dokazana je temeljem niskog stupnja genske raznolikosti mitohondrijske DNA (POLANC, 2003.; GOMERČIĆ i sur., 2006.), no na kraćem slijedu kontrolne regije i na vrlo malom broju uzoraka pa je bilo neophodno provesti istraživanje na dužem slijedu i većem broju uzoraka. Nadalje, osim na mitohondrijskoj DNA istraživanje je bilo potrebno provesti i na pouzdanijim i raznolikijim nuklearnim markerima (mitohondrijska DNA nasljeđuje se samo od majke) - mikrosatelitima.

Cilj istraživanja bilo je utvrditi da li su osnivački učinak (razvoj populacije iz šest naseljenih jedinki) i parenje u srodstvu doveli do gubitka genske raznolikosti u tolikoj mjeri da to ugrožava opstanak populacije, te ukoliko da – da li je nova reintrodukcija moguće rješenje za oporavak populacije risa u Hrvatskoj.

2. Pregled literature

2.1 Sistematika i evolucija euroazijskog risa

Rod ris (*Lynx*), koji obuhvaća četiri vrste, po sistematici spada u razred sisavaca (*Mammalia*), red zvijeri (*Carnivora*), porodicu mačaka (*Felidae*), potporodicu pravih mačaka (*Felinae*). Porodica mačaka (*Felidae*) danas obuhvaća 38 vrsta (JOHNSON i sur., 2006.) koje osim zajedničkih predaka i genetskih obilježja, dijele i karakterističnu građu tijela, osjetila, način života te tehnike lova. Mačke su predatori, mišićavih i elegantnih tijela, s razvijenim osjetilima, specijaliziranim zubima i pandžama te krznom koje se bojom prilagođava okolišu. Rasprostranjene su širom Europe, Azije, Afrike te Sjeverne i Južne Amerike.

Prvi poznati predstavnici porodice mačaka, kao i svih zvijeri, potječu od izumrle skupine *Miacoida*. Prve mačkolike zvijeri javile su se u Oligocenu, prije otprilike 35 miliona godina (JOHNSON i sur., 2006.). Najstariji poznati nalaz je vrsta *Proailurus lamanesis*, potječe iz Francuske iz razdoblja Oligocena, prije oko 30 milijuna godina. Početak razvoja mačaka nije u potpunosti poznat, a smatralo se da se većina rodova razvila u Africi, iz zajedničkog pretka koji je živio pred 10 do 15 milijuna godina. No novija istraživanja pokazuju da su se moderne mačke razvile u Aziji, te su tijekom niske razine mora u Miocenu migrirale na ostale kontinente (JOHNSON i sur., 2006.). Genetska istraživanja pokazuju da je migracijom iz Azije preko Beringa u Sjevernu Ameriku prešao zajednički predak pet od ukupno osam genetskih linija današnjih mačaka, među kojima je i risja linija (JOHNSON i sur., 2006.). Isto istraživanje upućuje da je predak euroazijskog i iberijskog risa zatim migrirao natrag u Euroaziju i to prije 1,6 do 1,2 miliona godina. Najstariji nalaz mačaka potječe iz kasnog Miocena (pred otprilike 9 milijuna godina), fosil vrste *Felis attica* pronađen na zapadu Euroazije (JOHNSON i sur., 2006.). Najstariji ostatci risa, stari približno 4 milijuna godina, pronađeni su u Africi (WERDELIN, 1981.). Ta vrsta, *Lynx issiodorensis*, smatra se pretkom svih današnjih risova. Tijekom starijeg Pleistocena je zbog velike geografske raširenosti *Lynx issiodorensis*-a došlo do postupne specijacije, te se iz te vrste u Sjevernoj Americi razvio do danas preživjeli crveni ris (*Lynx rufus*, Schreber 1777) i izumrla vrsta *Lynx issiodorensis kurteni*. U Europi se preko nekoliko izumrlih vrsta razvio iberijski ris (*Lynx pardinus*, Temminck 1872), dok se u Aziji razvio euroazijski ris (*Lynx lynx*, Linnaeus 1758) no nisu točno poznate vrste preko kojih je tekao razvoj. Tijekom mlađeg Pleistocena se euroazijski ris proširio u Europu gdje je na većini područja, osim na

Pirinejskom poluotoku, istisnuo iberijskog risa (KURTÉN i GRANQVIST, 1987.). Euroazijski ris se tijekom mlađeg Pleistocena proširio i u Sjevernu Ameriku, gdje se iz njega razvio kanadski ris (*Lynx canadensis*, Kerr 1792) (WERDELIN, 1981.).



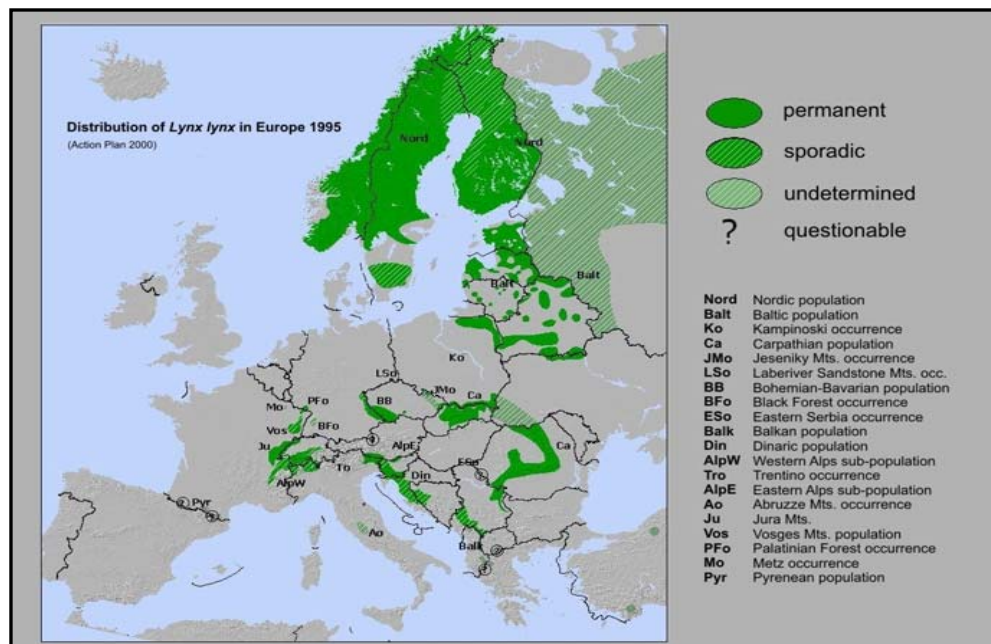
Slika 1. Kanadski, crveni, iberijski i euroazijski ris (u smjeru kazaljke na satu) (izvor arhiva projekta DinaRis)

2.2 Rasprostranjenost euroazijskog risa

Danas dva pripadnika roda ris žive u Sjevernoj Americi – kanadski (*Lynx canadensis*, Kerr 1792) i crveni ris (*Lynx rufus*, Schreber 1777), te dva u Europi – iberijski (*Lynx pardinus*, Temminck 1872) i euroazijski ris (*Lynx lynx*, Linnaeus 1758) (Slika 1.). Euroazijski ris prisutan je u središnjoj Aziji i Rusiji, dok u Europi nastanjuje područje Fenoskandinavije, Baltika i Karpata, te postoji nekoliko izoliranih populacija u zapadnoj i jugozapadnoj Europi (LINNELL i sur., 2007.) (Tablica 1., Slika 2.).

Tablica 1. Populacije euroazijskog risa u Europi

Naziv populacije	Zemlje	Autohtona/reintroduciran a
Nordijska	Švedska, Norveška, Finska	Autohtona
Baltička	Rusija, baltičke države, Poljska (Bialowieza)	Autohtona
Karpataska	Rumunjska, Slovačka, Poljska, Ukrajina, Češka, Mađarska, Srbija, Bugarska	Autohtona
Balkanska	Makedonija, Albanija	Autohtona
Dinarska	Hrvatska, Slovenija, Bosna i Hercegovina	Reintroducirana
Bohemijsko- Bavarska	Češka, Njemačka, Austrija	Reintroducirana
Alpska	Švicarska, Francuska, Italija, Austrija	Reintroducirana
Jura	Francuska, Švicarska	Reintroducirana
Vosges - Palatinian	Francuska, Njemačka	Reintroducirana

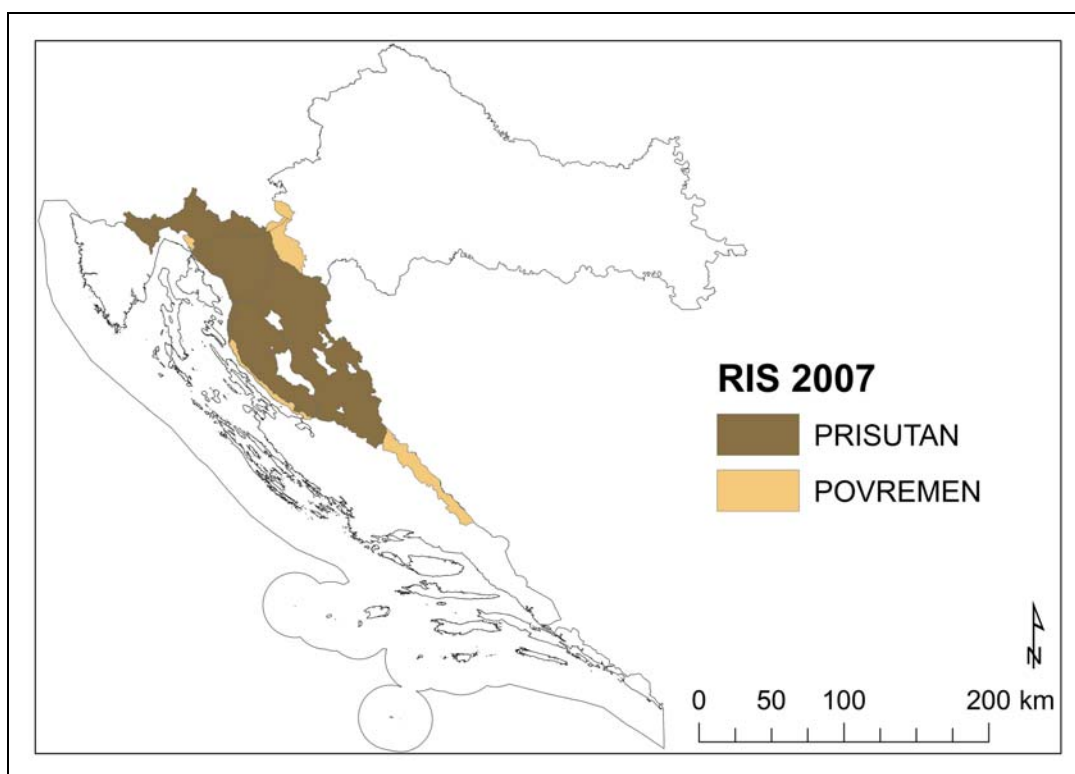


Slika 2. Karta rasprostranjenosti populacija euroazijskog risa u Europi (izvor BREITENMOSER i sur., 2000.)

Današnja rasprostranjenost risa u Europi je, osim djelovanja čovjeka, u velikoj mjeri posljedica događanja u mlađem Pleistocenu. Dva ključna događaja koja su se odigrala u tom razdoblju su prodor euroazijskog risa iz Azije u Europu te znatno smanjenje areala obje europske vrste risa tijekom vrhunca würmskog glacijala (KOS i sur., 2005.). Širenjem euroazijskog risa prema zapadu smanjivao se životni prostor iberijskog risa, no taj proces još nije u potpunosti istražen. I euroazijski i iberijski ris zabilježeni su na tlu Europe u to vrijeme (WOLSAN, 1993.), a neki nalazi pokazuju da su se obje vrste jedno vrijeme pojavljivale sipmatrično (na zajedničkom prostoru) (KURTÉN, 1968.). Pri kraju würmskog smrzavanja klima je bila sve oštrija, do vrhunca smrzavanja došlo je pred oko 20 000 godina i tada je veći dio Europe bio prekriven ledenim naslagama, tundrom i stepom. Šume su opstale na području Pirinejskog, Apeninskog i Balkanskog poluotoka, te u Karpatima (ZAGWIJN, 1992.), područjima koja se danas smatraju glacijalnim utočištima. Nije u potpunosti razjašnjeno kako su ovi uvjeti utjecali na izolaciju risa u glacijalnim utočištima, no pretpostavlja se da je došlo do fragmentacije distribucije (SOMMER i BENECKE, 2006.). Osim fosilnih ostataka pronađenih u Dalmaciji (MALEZ, 1986.), nema nalazišta koja bi upućivala na lokaciju risjeg glacijalnog utočišta (SOMMER i BENECKE, 2006.). Nakon vrhunca würmskog smrzavanja došlo je do zatopljenja i šumske površine su se počele širiti, te se time širio i areal risa (HEMMER, 1993.). No detalji rekolonizacije nisu još u potpunosti jasni.

Obitavanje risa od Pleistocena na prostoru današnje Hrvatske potvrđuje fosilni ostatak gornjeg očnjaka odraslog risa, pronađen u Velikoj pećini, špilji na Ravnoj gori. Nalaz je prvi determinirao MALEZ (1986.), a revizijom potvrdio GUŽVICA (1996.). Stratigrafski položaj zuba upućuje na starost od oko 10 000 godina, dakle kraj posljednjeg ledenog doba.

U Hrvatskoj se aktualnim staništem euroazijskog risa drže šumovita brdsko-planinska područja Dinarida, od hrvatsko - slovenske granice na sjeverozapadu do granice s Bosnom i Hercegovinom na jugoistoku (Slika 3.). Područje stalnog rasprostranjenja risa u Hrvatskoj iznosi 9 573.4 km², a povremenog 1 748.9 km² (SINDIČIĆ i sur., 2010b.).



Slika 3. Rasprostranjenost euroazijskog risa u Hrvatskoj (izvor SINDIČIĆ i sur., 2010b.)

2.3 Biologija euroazijskog risa

Euroazijski ris najveći je od četiri vrste risova. Masa odraslih jedinki kreće se u rasponu od 15 do 30 kg. Srednja tjelesna masa odraslih mužjaka risova u Hrvatskoj je $21,9 \pm 3,9$ kg (u rasponu od 15 do 28 kg), a kod ženki $18,4 \pm 3,2$ kg (u rasponu od 12 do 25 kg) (GOMERČIĆ, 2005.). Dužina tijela je 0,8 do 1,3 m, dok je kratak rep dugačak od 15 do 20 cm na vrhu prekriven crnom dlakom. Kao i sve mačke, risovi imaju okruglastu glavu kratke njuške, zubalo s 28 zuba i jakim očnjacima te kutnjacima oštarih rubova. Zubna formula glasi I 3/3 C 1/1 P 2/2 M 1/1 (GOMERČIĆ i sur., 2009.). U usporedbi s drugim risovima imaju relativno duge noge i to stražnje duže od prednjih. Velike šape upućuju na dobru prilagodbu za kretanje po snijegu, a također im na šapama tijekom zime naraste gušća dlaka. Na prednjim nogama imaju po pet, a na stražnjim četiri prsta s pandžama koje mogu uvući te se tako tiše kretati (BREITENMOSER i sur., 2000.; FRKOVIĆ, 2003.). Zbog toga je risji trag karakterističan u usporedbi s tragovima vuka ili lisice s kojima bi ih promatrač u Hrvatskoj mogao zamijeniti. Gledajući trag risa nikada

se ne vidi trag pandže (KACZENSKY i HUBER, 1997.). Tijelo je pokriveno gustim krznom, a na vrhu šiljastih ušiju raste pramen (čuperak) crnih dlaka dugačkih do 4 cm. Boja krzna je svijetlosmeđa do crvenkasta, tamnije nijanse po hrptu i bokovima, a na trbuhu i unutarnjoj strani nogu je bijela. Pjegasta pigmentacija krzna, specifična je za svaku jedinku po broju i rasporedu pjega (Slika 4.).



Slika 4. Primjeri obojenosti krzna risa iz Hrvatske

Risovi, s izuzetkom ženki s jednogodišnjim mladuncima, žive samostalno unutar određenog prostora a u kontakt s drugim jedinkama svoje vrste dolaze jedino u vrijeme parenja. Mužjaci ne sudjeluju u skrbi za mladunce, te se tijekom sezone parenja međusobno natječu za ženke. Zato se njihovi životni prostori preklapaju s životnim prostorima ženki, te iz njih pokušavaju izgurati ostale mužjake. Euroazijski risovi pare se od veljače do travnja, a nakon 69 dana gravidnosti ženka okoti od 1 do 4 (u prosjeku 2) slijepa mladunca (slijepi su 16-17 dana). Mladi risovi (Slika 5.) se odvoje od majke nakon 10 mjeseci, te pronalaze vlastiti životni prostor. Ženke postanu spolno zrele nakon što navrše 10 do 20 mjeseca, a mužjaci nakon 30 mjeseci. Reproductivni uspjeh populacije risa prije svega ovisi o uvjetima okoliša, odnosno o gustoći plijenskih vrsta. Ženke euroazijskog risa se u pravilu pare od spolne zrelosti do kasne starosti od 12 – 13 godina. Životinja može doživjeti i do 18 godina, ali u prirodi većina životinja strada već u prvoj ili drugoj godini života (KVAM, 1990.; KVAM, 1991.).



Slika 5. Ženka euroazijskog risa s mladuncem (izvor arhiva projekta DinaRis)

Risovi su najaktivniji u jutarnjim i večernjim satima dok se tijekom dana i noći uglavnom odmaraju. Euroazijski ris ima dobar dnevni vid, još izraženiji noćni, dobar njuh, te izrazito dobar sluh s vrlo širokim rasponom frekvencija. Glavna su im hrana parnoprstaši – srne, jeleni, divokoze, jelen lopatar i muflon. Manji plijen lovi samo ako većeg nema dovoljno, no moguće je da je manji plijen važan za mlade risove tijekom osamostaljivanja. Smatra se da su puhovi vrlo važan izvor hrane u godinama njihovog obilja. Izbor plijena u velikoj mjeri ovisi i o brojnosti pojedinih plijenskih vrsta. Lovi sve kategorije malih papkara, dok kod jelena bira mlade, manje i/ili oslabljene životinje, prije svega košute i telad. Tijekom zime love krupnu divljač, a sposobni su uloviti plijen 3 do 4 puta veći od njih samih. Ovisno o veličini plijena koji ulove vraćaju se na isti plijen sve dok ga ne pojedu, a to može biti i do 7 dana (TUMLISON, 1987.). U Švicarskoj je zastupljenost plijena kojim se risovi hrane: 70% srne, 21% divokoze, 6% lisice, 2% zečevi, iako ishrana jako ovisi o zastupljenosti pojedine divljači na području gdje žive (BREITENMOSER i HALLER, 1993.). U Hrvatskoj i Sloveniji je na osnovi 37 pretraženih želudaca zaključeno da su srne i jeleni zastupljeni u prehrani risa s 80%, i to je bila gotovo jedina hrana odraslih mužjaka, dok su ostaci još 8 životinjskih vrsta nađeni samo kod ženki i neodraslih primjeraka (RAJKOVIĆ i sur., 2000.). Risovi u prosjeku na dan pojedu 1-2,5 kg plijena i to mišićno tkivo, mast, te sve unutarnje organe osim probavne cijevi (BREITENMOSER i sur., 2000.).

Ris lovi sam, a važan element uspješnog lova je iznenađenje te plijen napada iz zasjede. Za uspješan lov ris se mora plijenu približiti na nekoliko metara jer plijen ne naganja, te ako napad ne uspije u 20 – 50 metara, odustane. Ris usmrćuje plijen ugrizom u vrat s donje (pritisak na dušnik) ili s gornje strane (lom kralježnice). Nakon što zaskoči plijen i ostane visjeti jakim ugrizom u području vrata, ris čeka da životinja iskrvari ili se uguši. Hranjenje počinje s najkvalitetnijim dijelovima i to mesom s buta plijena, pa zatim plečke i ostalih dijelova tijela (KACZENSKY i HUBER, 1997.). Vrijeme prehranjivanja s jednim plijenom logaritamski raste s masom plijena, a također ovisi i o broju jedinki (majka s mladuncima ili jedna životinja), starosti i veličini risa. Pri tome ris često plijen sakrije zemljom i lišćem te se sljedećih nekoliko dana vraća na plijen (osobito mužjaci).



Slika 6. Plijen risa

Veličina životnog prostora euroazijskog risa je promjenjiva, u prosjeku veća kod mužjaka nego ženki, te u Europi raste prema sjeveru areala. Osim spola, na veličinu životnog prostora utječe i dostupnost plijena te stupanj primarne produkcije određenog prostora (BREITENMOSER i HALLER, 1993.; HERFINDAL i sur., 2005.). U Europi se raspon životnih prostora mužjaka kreće od 180 do 2780 km², a ženki od 98 do 759 km² (BREITENMOSER i sur., 2000.). Svoje područje risovi obilježavaju, kao i većina mačaka, urinom. U Hrvatskoj istraživanja o kretanju risova započela su 2001. godine (FRKOVIĆ, 2002.; GOMERČIĆ i ĐURAS, 2002.), a do sada je praćeno ukupno sedam životinja (SINDIČIĆ, 2009a.; SLIJEPČEVIĆ, 2009.; SLIJEPČEVIĆ i sur., 2009.). Do sada prikupljeni podatci pokazuju da risovi u Gorskom kotaru imaju slična dnevna

kretanja kao risovi u Poljskoj, a identične kao risovi u Sloveniji (SLIJEPČEVIĆ, 2009.; SLIJEPČEVIĆ i sur., 2009.).

2.4 Povijest upravljanja euroazijskim risom u Europi i Hrvatskoj

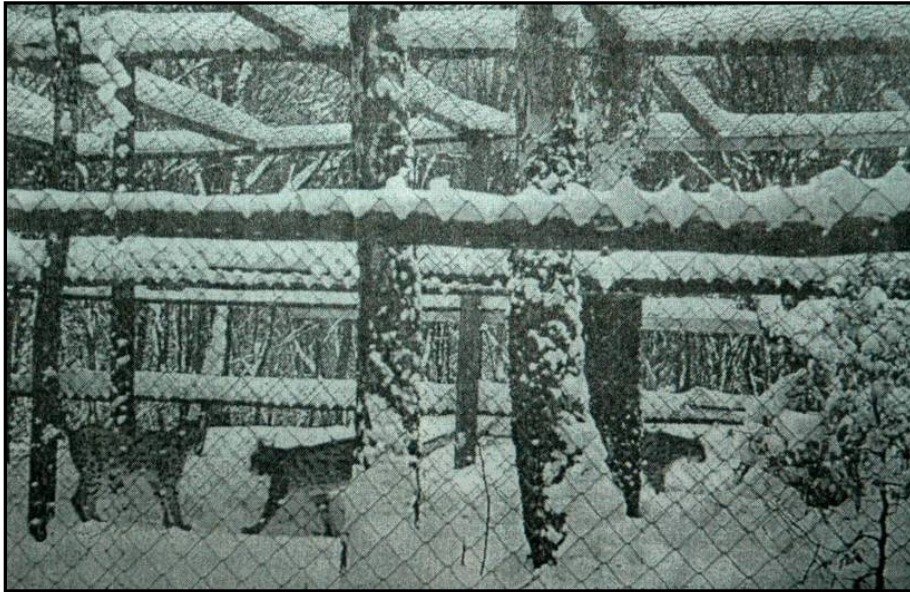
Euroazijski ris je vrsta sa širokom ekološkom valencijom, što se u prošlosti očitivalo u velikoj raširenosti vrste koja je naseljavala sva šumska, pa i neka ne šumska staništa Europe, od Skandinavije do Sredozemlja, te do Crnoga mora (KRATOCHVIL, 1968.; MATJUŠKIN, 1978.). U većini područja zapadne i srednje Europe ris je preživio sve do početka 19. stoljeća (KRATOCHVIL, 1968.). Oko 1 800. godine ris je još uvijek bio prisutan na širem području Alpa, na Balkanskom poluotoku sve do Grčke, na području Tatri, Karpata, na području cijele današnje zapadne Europe, pribaltičkih država, Finske i Skandinavije. Nakon toga je uslijedilo stoljeće ubrzanog izumiranja, te je na kraju 19. odnosno početkom 20. stoljeća ris nestao iz cijele zapadne i srednje Europe, s iznimkom gorskih i srednjegorskih područja zapadnih Karpata. Na Balkanskom poluotoku je opstala populacija u Šarsko – Pindskom gorju. U Skandinaviji je preživjela populacija samo na sjevernom dijelu poluotoka. Jedino veće područje proširenosti risa je ostala ruska nizina do granice s Finskom na zapadu, istočni dio pribaltičkog područja, te sve do današnje sjeveroistočne granice Poljske na jugu. Dakle, ris se do 20. stoljeća održao prvenstveno na planinskim i rijetko naseljenim područjima Europe.

Za razliku od kanadskog risa (*Lynx canadensis*), koji je prehrambeno specijaliziran, prehrambeni spektar euroazijskog risa je raznolikiji i obuhvaća od glodavaca i zečeva do parnoprstaša (BREITENMOSER i HALLER, 1987.). To pokazuje, da je ris prilagodljiva vrsta, koja se načinom života prilagođava okolišu u kojem živi (BREITENMOSER i sur., 1998.). Stoga najvažniji uzroci izumiranja risa u Europi jesu promjene u okolišu. Pri tome su na različitim područjima prevagnuli različiti čimbenici (KRATOCHVIL i VALA, 1968.). U trenutku kada je lov prestao biti isključivo pravo plemstva i crkvenih dužnosnika, zanimanje za lovne vrste (ponajprije parnoprstaše) je u Europi vrlo poraslo. Posljedično se povećalo i proganjanje zvijeri. Često je to proganjanje bilo dobro isplanirano, zakonski organizirano i nagrađivano. Tako zakonodavstvo austro-ugarskih država u 18. stoljeću provodi kampanju organiziranog smanjivanja brojnosti velikih zvijeri. Proganjanje su nagrađivati poticali i talijani, te su za odraslog risa plaćali

20 kruna, a za mladoga 4 krune (FRKOVIĆ, 2003.). Osim toga kože risa su otkupljivane na brojnim mjestima u Europi, te je time dodatno poticano ubijanje (KRATOCHVIL, 1968.). Intenzivan progon risa u Europi krenuo je već od 15. stoljeća, dok su se učinci očitovali sve do početka 20. stoljeća. No, smatra se da takvo proganjanje nije samostalno uzrokovalo opsežno izumiranje risa u Europi, već su tome doprinijeli i gubitak staništa te pad gustoće populacije plijena.

Od 15. do 17. stoljeća u Europi se najviše koristio otvoreni tip ispaše, gdje je stoka pasla na velikim površinama tijekom cijele godine (KRATOCHVIL i VALA, 1968.). Time su domaće životinje bile izložene napadima predatora. Osim toga ispaša je utjecala na prirodnu obnovu te prijelaz šuma u pašnjake (BREITENMOSER i sur., 1998.). Opseg intenzivnih poljoprivrednih površina se drastično povećao, te je naglo porastao i broj stanovništva. Sve je to dovelo do istiskivanja šuma i gubitka staništa za risa u svim nizinskim, odnosno gušće naseljenim područjima Europe u 15. i 16., a najviše u 17. stoljeću (KRATOCHVIL i VALA, 1968.). Areal risa je postao rascjepkaniji, a udaljenosti među pojedinim populacijama sve veće. Fragmentacija i izolacija su doveli do smanjenja populacija koje su time postale podložnije negativnim okolišnim i demografskim čimbenicima. Osim toga brojnost velikih papkara, prije svega srna, drastično je pala u brojnim područjima Europe (BREITENMOSER i sur., 1998.), a u pojedinima je došlo i do potpunog izumiranja srna i divljih svinja.

Navedeni uzroci doveli su i do nestajanja risa s područja Dinarida. Posljednji primjerci autohtonog risa ulovljeni su u Hrvatskoj 1903. (KORITNIK, 1974.), Sloveniji (KOS, 1928.) i Srbiji 1908., Bosni i Hercegovini 1911., Crnoj Gori 1913. godine (MAJIĆ, 2004.). U Hrvatskoj se ris najduže zadržao u Gorskom kotaru i na Velebitu. Jedan od posljednjih risova u masivu Risnjaka, na području današnjeg Nacionalnog parka Risnjak, uhvaćen je u «gvožđa» 1854. (HIRC, 1898.). Smatra se da je posljednji ris u Hrvatskoj ulovljen u stupicu u šumama oko Čabra, Gorski kotar, 1903. godine (KORITNIK, 1974.). Autohtoni Balkanski ris preživio je jedino u izoliranim područjima Albanije, Makedonije, Kosova i Crne Gore (VON ARX i sur., 2004.).



Slika 7. Reintroducirane životinje u karanteni u Kočevskom (izvor arhiva projekta DinaRis)

Početkom sedamdesetih godina 20. stoljeća zaživjela je ideja da se na području Kočevja u Sloveniji ponovno naseli ris kao lovna vrsta. Tako su u siječnju 1973. godine tri mužjaka i tri ženke podrijetlom iz karantene životinjskog vrta Stromovka u Ostravi (današnja Slovačka) dopremljene u karantenu u Sloveniji (Slika 7.). Ispuštanjem šest risova, iz karantene u Kočevskom 2. ožujka 1973. godine, ova je velika zvijer spontanim premještanjem nakon gotovo jednog stoljeća ponovno živjela u Hrvatskoj. Tri naseljene ženke su se prvih godina neometano razmnožavale, brojnost je rasla i populacija je proširila svoje stanište u Sloveniji, te se ustalila u Hrvatskoj i u zapadnom dijelu Bosne i Hercegovine. Prvi odrasli primjerak u Hrvatskoj uočen je na gorskoj livadi Lazac u Nacionalnom parku Risnjak 16. lipnja 1974. (FRKOVIĆ, 1998.).



Slika 8. Prvi ris odstrijeljen u Hrvatskoj nakon reintrodukcije, Gorski kotar 1978. godine
(autor A. Frković)

Činjenica da su reintroductory životinje iz slovačkih Karpata još uvijek je predmet prigovora dijela lovaca, a zbog vjerovanja da je autohtoni ris bio znatno manji i da se nije hranio većom divljači. No morfometrijska istraživanja dokazala su da ne postoje značajnije statističke razlike u veličini lubanja autohtonih i reintroductory životinja (GOMERČIĆ, 2005.; GOMERČIĆ i sur., 2010.).

Može se smatrati da je reintroductory populacija risa imala pozitivan trend u smislu porasta broja jedinki i u smislu prostornog širenja od reintrodukcije sve do sredine '80-tih godina prošlog stoljeća. Tada je populacija stagnerala na svom vrhuncu, a u '90-tima je došlo do početka kontinuiranog pada brojnosti, te stabilizacije na sadašnjoj nižoj razini, a vjerojatno i daljnjeg pada. Iako je ris 1982. godine u Hrvatskoj proglašen zaštićenom vrstom, do 1998. godine odobravale su se godišnje kvote za odstrel, jer se smatralo da je populacija stabilna (FRKOVIĆ, 1998.). U razdoblju od 1978. kada je u Hrvatskoj ubijen prvi ris iz reintroductory populacije (Slika 8.) do 2009. godine zabilježena je smrtnost ukupno 233 životinje (SINDIČIĆ, 2009a.). Važno je naglasiti da je prvih dvadeset godina nakon reintrodukcije udio krivolova u ukupnoj zabilježenoj smrtnosti bio tek 8%, dok posljednjih deset godina taj postotak raste na preko 80% zabilježene smrtnosti (SINDIČIĆ i sur., 2008.). Prisutnost krivolova potvrđuje i tekst mr.

sc. Josipa Malnara, potpredsjednika Lovačkog saveza Hrvatske, koji je poznavatelj lovstva u Hrvatskoj i jedna od ključnih osoba lovstva Gorskog kotara: „...iz vlastitih saznanja, ris nemilice odstrjeljuje, čak i u zajedničkim lovovima“ (MALNAR, 2010.). Međutim, do sada su tek za dva dokazana slučaja krivolova, 2003. i 2005. godine, donesene sudske presude i izrečene novčane kazne (SINDIČIĆ, 2009a.). Smatra se da je posljednjih desetak godina brojnost risa u Dinaridima u padu, te da danas u Hrvatskoj živi najviše 40 do 60 životinja, a zajedno sa Slovenijom i Bosnom i Hercegovinom (dinarska populacija) ispod 130 (SINANOVIĆ i sur., 2008.; SINDIČIĆ i sur., 2010a., SINDIČIĆ i sur., 2010b.). Glavnim uzrocima pada brojnosti drže se nedostatak plijena, smrtnost uzrokovana ljudskim aktivnostima te gubitak genetske raznolikosti zbog parenja u srodstvu (SINANOVIĆ i sur., 2008.; SINDIČIĆ, 2009b.; SINDIČIĆ i sur., 2010b.).

Euroazijski ris je u Hrvatskoj i Europi ugrožena vrsta. U Hrvatskoj je zaštićen temeljem Zakona o zaštiti prirode (NN br. 30/94, 126/03) i Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim, te mnogim međunarodnim ugovorima i konvencijama. Hrvatska je preuzela obveze zaštite risa potpisivanjem sljedećih konvencija: Konvencija o biološkoj raznolikosti; Bernska konvencija, Konvencija CITES, Habitat direktiva (NATURA 2000), Uredba EU zajednice o zaštiti vrsta divlje faune i flore reguliranjem trgovine. Osim toga, u Hrvatskoj je od 2005. godine na snazi Plan upravljanja risom koji definira sve aktivnosti koje je potrebno provesti da bi se osigurao dugoročan opstanak vrste u suživotu s ljudima (MAJIĆ, 2004.; SINDIČIĆ i sur., 2010b.). Izrađen je i zajednički hrvatsko – slovenski plan upravljanja risom, budući da životinje ne poznaju granice i zaštita se treba provoditi na razini populacije (MAJIĆ SKRBINŠEK i sur., 2008.).

2.5 Metode molekularne genetike u istraživanjima populacija

Tijekom posljednja dva desetljeća lančana reakcija polimerazom (PCR) i sekvencioniranje (određivanje sljedova nukleotida) DNA, kao osnovne istraživačke metode u molekularnoj genetici, postale su učinkovite i ekonomski prihvatljive širem krugu znanstvenika (AVISE, 2004.). Također je razvijeno nekoliko novih genetskih markera kao što su mikrosateliti (JARNE i LAGODA, 1996.) i polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP – single nucleotide polymorphism) (MORIN i sur., 2004.),

te su unaprijeđeni kompjuterski programi za obradu podataka što je omogućilo primjenu molekularnih tehnika u mnogim istraživačkim područjima. Napredak u spoznajama o ekologiji, evoluciji, konzervacijskoj biologiji, upravljanju populacijama i mnogim drugim granama danas je nezamisliv bez molekularne genetike, a razvijaju se i nove multidisciplinarnе grane kao što su molekularna ekologija (ekološka genetika), konzervacijska genetika i populacijska genetika. Molekularna ekologija pomoću molekularne genetike istražuje ekologiju i evoluciju divljih organizama (FREELAND, 2005.). Konzervacijska genetika istražuje čimbenike koji utječu na rizik od izumiranja vrsta i upravljačke prakse koje je potrebno provesti da se ti rizici smanje (FRANKHAM i sur., 2002.). Populacijska genetika istražuje genetsku osnovu evolucije, a prvenstveni objekt istraživanja su frekvencije i sposobnost preživljavanja genotipova prirodnih populacija (GILLESPIE, 2004.). Sve navedene grane istraživanja doprinose razumijevanju biologije vrsta, rješavanju taksonomskih pitanja, određivanju filogenetskih odnosa, istraživanju strukture populacija, srodstva i hibridizacije, te planiranju zaštite ugroženih vrsta i upravljanja istima. Glavna zadaća molekularne genetike u istraživanju populacija jest očuvanje genske raznolikosti.

2.6 Genska raznolikost

Gensku raznolikost čine razlike u slijedu nukleotida u molekuli DNA. Pri tome male varijacije mogu rezultirati različitim aminokiselinskim slijedom u proteinima za koje ti geni kodiraju (engl. replacement polymorphism), a taj slijed može utjecati na njihovu biokemijsku funkciju ili može dovesti do morfoloških nejednakosti koje utječu na reprodukciju, ponašanje ili preživljavanje jedinki u populaciji.

Genska raznolikost jest raznolikost alela i genotipova prisutnih u istraživanoj skupini, bilo da se radi o populaciji, vrsti ili skupini vrsta (FRANKHAM i sur., 2002.). Ukoliko na lokusu u istraživanoj skupini postoji više od jednog alela kažemo da je lokus polimorfan, uz uvjet da se najučestaliji alel pojavljuje s frekvencijom manjom od 0.99 ili 0.951. Ukoliko su svi pripadnici skupine homozigoti na istraživanom alelu kažemo da je lokus fiksiran.

Genska raznolikost nastaje kao posljedica mutacija (većina mutacija nastaje tijekom replikacije DNA) i rekombinacija. Smatra se da pri tome vrijede i neutralna i

teorija selekcije, odnosno da dio raznolikosti nastaje kao posljedica nasumičnog procesa (polimorfizam nastaje slučajno i zadržava se ili gubi slučajno), a dio kao posljedica prirodne selekcije mutacija koje doprinose sposobnosti preživljavanja (FREELAND, 2005.). Smatra se da je genska raznolikost ovisna o razini mutacije (broj novih mutacija po nukleotidnom lokusu i po generaciji) i efektivnoj veličini populacije (N_e) tj. broju jedinki koje se razmnožavaju u populaciji, tako da populacije male efektivne veličine uglavnom imaju i nisku gensku raznolikost (ELLEGREN, 2009a.; ELLEGREN, 2009b.).

Genska raznolikost predstavlja evolucijski potencijal vrste i važna je za sposobnost prilagodbe na promjene u okolišu. Ona zapravo predstavlja sirovi materijal za evoluciju pod utjecajem prirodne selekcije, genetskog otklona i migracija (ELLEGREN, 2009a.). Gubitak genske raznolikosti povezan je sa smanjenom reprodukcijom moći (engl. reproductive fitness), a dugoročno uzrokuje smanjenje ili čak gubitak evolucijskog potencijala neke populacije ili vrste (HANSSON i WESTERBERG, 2002.). Reprodukcijska moć (engl. reproductive fitness) definira se kao broj plodnih potomaka jedinke koji prežive do reproduktivnog razdoblja (FRANKHAM i sur., 2002.). Genska raznolikost je važna jer je povezana s obilježjima vezanim za sposobnost preživljavanja, kao što su rast i razvoj, plodnost, metabolička učinkovitost i otpornost na bolesti (ALLENDORF i LEARY, 1986.; FALCONER i MACKAY, 1996.).

Do gubitka genske raznolikosti najčešće dolazi kod malih, izoliranih populacija i populacija koje su prošle kroz razdoblje "uskog grla" (engl. bottleneck) (ALLENDORF, 2002.; LUCCHINI i sur., 2004.; LAIKRE i sur., 1996.; CRNOKRAK i ROFF, 1999.). Pad brojnosti populacije dovodi do parenja u srodstvu (engl. inbreeding), populacije gube demografsku stabilnost, udio parenja u srodstvu sve više raste a brojnost pada. Ova povratna sprema između pada brojnosti populacije, gubitka genske raznolikosti i parenja u srodstvu se na engleskom naziva „extinction vortex“ (FRANKHAM i sur., 2002.). Većina ugroženih vrsta i populacija ima nižu gensku raznolikost nego populacije i vrste koje nisu ugrožene i prisutne su u velikom broju. Od 38 ugroženih vrsta sisavaca, ptica, kukaca i biljaka, njih 32 je imalo nižu razinu genske raznolikosti od srodnih vrsta koje nisu bile ugrožene (FRANKHAM, 1995.).

Genska raznolikost jedinki se opisuje kao udio heterozigotnih lokusa ili alela na svakom lokusu (HEDRICK, 2000.). Na razini populacije raznolikost se opisuje kao udio polimorfnih lokusa (P), raznolikost alela tj. prosječan broj alela po lokusu (N_a), efektivan broj alela po lokusu (N_e), kao očekivana (H_e) i uočena heterozigotnost (H_o), genska raznolikost (h) i nukleotidna raznolikost (π) (NEI, 1973.; LACY, 1997.).

Osnovni alat za istraživanje genetske raznolikosti su genetski markeri, pomoću kojih se određuje prisutnost određenih alela u populaciji (CONNER i HARTL, 2004.). Razvojem istraživačkih metoda u upotrebu ulaze molekularni markeri (za razliku od fenotipskih markera), a temeljna metoda istraživanja molekularnih markera je elektroforeza (razdvajanje molekula na gelu upotrebom električne struje). Neki od najčešće korištenih molekularnih markera su polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata – RFLP (engl. restriction fragment length polymorphism), nasumično umnožena polimorfna DNA – RAPD (engl. random amplified polymorphic DNA), polimorfizam duljine umnoženih fragmenata – AFLP (engl. amplified fragment length polymorphism), polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP (engl. single nucleotide polymorphism), polimorfizam jednolančane konformacije – SSCP (engl. single strand conformational polymorphisms), metoda minisatelita ili varijabilni broj uzdužno opetovanih sljedova – VNTR (engl. variable number tandem repeats). Genetski markeri korišteni u ovom istraživanju su kontrolna regija mitohondrijske DNA (mtDNA) i mikrosateliti.

Više markera istraživanih unutar iste populacije mogu pokazati različite vrijednosti genetske raznolikosti te populacije, što ovisi o brzini mutacije pojedinog markera.

Genska raznolikost se danas uglavnom istražuje pomoću neutralnih markera, budući još nije razvijena tehnologija istraživanja kodirajućih, funkcionalno važnih lokusa (VALI i sur., 2008.). Iako ne kodiraju za sintezu aminokiselina, neutralni markeri su koristan indikator funkcionalne genetske raznolikosti, budući među njima postoji korelacija jer oboje ovise o efektivnoj veličini populacije (N_e) (VALI i sur., 2008.). No smatra se da neutralni molekularni markeri možda gube raznolikost brže nego lokusi koji utječu na sposobnost preživljavanja (REED i FRANKHAM, 2003). Godine 2008. VALI i sur. su istraživali u kojoj mjeri mikrosateliti reflektiraju gensku raznolikost, uspoređujući raznolikost mikrosatelita i 10 gena (najčešće jedan intron za svaki gen) nekoliko populacija zvijeri (vuk, kojot, euroazijski ris i žderonja). Zaključili su da postoji pozitivna korelacija između nukleotidne raznolikosti i heterozigotnosti mikrosatelita unutar populacije (ta korelacija nije pronađena na individualnoj razini), no da je varijacija veća kod nukleotidne raznolikosti nego kod heterozigotnosti mikrosatelita. Kao posljedica toga dvije populacije sa sličnom heterozigotnosti mikrosatelita mogu se značajno razlikovati u sveukupnoj genetskoj raznolikosti.

2.7 „Usko grlo“ (engl. bottleneck)

Uskim grlom (engl. bottleneck) se naziva pojava kada se brojnost populacije izrazito smanji (CONNER i HARTL, 2004.). U tim slučajevima genska raznolikost se gubi kao posljedica pojave razmnožavanja u bliskom srodstvu (engl. inbreeding) i genetskog pomaka (engl. genetic drift). Genetski pomak uzrokuje nasumične promjene u frekvenciji alela između dvije generacije, pri čemu dolazi do povećanja homozigotnosti, a značajan je kod malih populacija kod kojih dovodi do porasta frekvencije ili čak fiksiranja štetnih alela (HEDRICK i MILLER, 1992.; CONNER i HARTL, 2004.). Naime, potomci nasumično nasljeđuju alele roditelja. Pri tome kod malih populacija pojedini aleli, osobito oni rijetki, mogu biti izgubljeni ili fiksirani, a frekvencija alela kod potomaka se razlikuje od one kod roditelja. Kod velikih populacija frekvencija štetnih alela je niska zbog ravnoteže između mutacija i prirodne selekcije. No, kod malih populacija selekcija nije tako učinkovita, zbog čega raste frekvencija štetnih alela i u dužem razdoblju genetski otklon može dovesti do njihovog fiksiranja uzrokujući pad brojnosti populacije i izumiranje (pojava se engl. naziva mutational meltdown) (FRANKHAM, 2005.).

Učinak uskog grla na populaciju ovisi o veličini na koju je populacija reducirana i brzini kojom će se oporaviti. Inicijalni gubitak alela proporcionalan je redukciji veličine, no populacija kojoj brojnost ne raste nastaviti će gubiti raznolikost pod utjecajem genetskog otklona, za razliku od one koja se brojčano oporavi (FREELAND, 2005.). Također je važno naglasiti da usko grlo može različito utjecati na jezgrinu i organsku DNA (npr. mtDNA). Budući da je organska DNA predstavlja manju efektivnu veličinu populacije, učinak uskog grla će tu biti jači i očitiji. Primjer je istraživanje provedeno na skandinavskoj populaciji smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) za koju se zna da je prošla usko grlo. Pod utjecajem uskog grla raznolikost mtDNA je izgubljena i opstala su samo dva haplotipa, dok je raznolikost mikrosatelita ostala očuvana i približno je jednaka onoj u populacijama medvjeda koje nisu prošle usko grlo (WAITS i sur., 2000.). Osim broja osnivača tj. brojnosti populacije i brzine oporavka, na gensku raznolikost nakon uskog grla značajno utječu i migracije. Ukoliko je populacija izolirana i nema kontakta sa susjednim populacijama gubitak genske raznolikosti biti će izraženiji nego u onih koje primaju povremene migrante (FREELAND, 2005.).

Poseban oblik uskog grla jest pojava kada nova populacija nastane na temelju tek nekoliko osnivača, pojava koja se naziva učinak osnivača (engl. founder effect), što se najčešće javlja prilikom reintrodukcija. Tada osnivači nove populacije donose tek dio gena njihove izvorne populacije. I u ovakvim slučajevima gubitak genetske raznolikosti povezan je s brojem osnivača i brzinom rasta populacije.

2.8 Depresija zbog parenja u srodstvu

Postoji više definicija parenja u srodstvu (engl. inbreeding), a najčešće se upotrebljava ona po kojoj je to parenje među jedinkama u populaciji koje su u bližem srodstvu nego što bi to bilo očekivano kod nasumičnog parenja (CONNER i HARTL, 2004.). Kao posljedica takvog parenja dolazi do povećanja homozigotnosti na svim lokusima, povećane mogućnosti očitovanja štetnih alela i tzv. depresije zbog parenja u srodstvu (engl. inbreeding depression), što je praćeno smanjenom sposobnošću reprodukcije i preživljavanja (engl. reproductive fitness) (HEDRICK, 2000.; HEDRICK, 2002.; FRANKHAM i sur., 2002.). Populacija u kojoj se javlja parenje u srodstvu odstupa od Hardy – Weinbergove ravnoteže. Parenje u srodstvu ne mijenja frekvenciju alela u populaciji, ali redistribuira frekvenciju genotipova povećavajući udio homozigota i omogućavajući očitovanje recesivnih alela (KELLER i WALLER, 2002.).

Dokazano je da parenje u srodstvu povećava rizik od izumiranja zbog negativnog učinka na sposobnost populacije da se nosi s promjenama u okolišu (FRANKHAM, 2005.). Prvi dokazi o povezanosti parenja u srodstvu s izumiranjem dobiveni su laboratorijskim pokusima i namjernim parenjem u srodstvu domaćih životinja i biljaka (FRANKHAM i sur., 2002.). Između 80% i 95% populacija kod kojih je izazvano namjerno parenje u srodstvu izumrle su nakon osam generacija parenja između braće i sestara ili nakon tri generacije samo-oplođivanja (FRANKEL i SOULE, 1981.). RALLS i BALLOU još su 1983. godine potvrdili da je kod 41 od 44 istraženih populacija sisavaca parenje u srodstvu uzrokovalo povećanu smrtnost mladunčadi.

Parenje u srodstvu se prvenstveno negativno očituje na sposobnost razmnožavanja, što uključuje broj i kvalitetu spermija, broj potomaka i njihovo preživljavanje, težinu potomaka i razmak između dva legla (FRANKHAM i sur., 2002.). Dokazano je da se kao posljedica parenja u srodstvu javlja smanjena sposobnost

razmnožavanja (SLATE i sur., 2000.), niža koncentracija i pokretljivost spermija te aplazija testisa (WILDT, 1996., ROLDAN i sur., 1997., SEYMOUR i sur., 2001.), niža porođajna težina i niži postotak preživljavanja mladunčadi (LACY i sur., 1996., COLTMAN i sur., 1998.). No, parenje u srodstvu ne utječe samo na sposobnost razmnožavanja, već negativno utječe i na sveukupnu sposobnost preživljavanja (KELLER i WALLER, 2002.). Npr. kao posljedica parenja u srodstvu zabilježena je slabija otpornost na parazitarna oboljenja (COLTMAN i sur., 1999., JOHNSON i sur., 2010.). Učinak depresije zbog parenja u srodstvu je izrazitiji u nepovoljnijim okolišnim uvjetima, kao što su neuobičajeno jake kiše, promjenjive temperature, ograničeni izvor hrane, što primarno uzrokuje slabiji postotak preživljavanja mladunčadi (CRNOKRAK i ROFF, 1999.).

Štetne posljedice parenja u srodstvu zabilježene su kod većine predstavnika porodica zvijeri (LAIKRE, 1999.). Kod vukova su zabilježene različite promjene nastale kao posljedica parenja u srodstvu - smanjena veličina tijela vuka u zatočeništvu u Meksiku, sljepoća vukova u zatočeništvu u Skandinaviji, deformacije kralježaka u vukova s otoka Isle Royale, pad reproduktivne sposobnosti ženki, smanjena veličina legla, kraći životni vijek, pad težine, te sljepoća kod vukova u nordijskim zoološkim vrtovima (ELLEGREN i sur. 1996.; ELLEGREN, 1999.; LAIKRE, 1999.). Istraživanja su dokazala da je parenje u srodstvu kod puma iz Floride (*Puma concolor coryi*) dovelo do gubitka genske raznolikosti, što je uzrokovalo slabiju kvalitetu sperme, nižu razinu testosterona, pad reproduktivnog kapaciteta, kriptorhizam u više od 80% mužjaka, defekte srčanih zalistaka, te povećanu učestalost parazitarnih i zaraznih oboljenja (JOHNSON i sur., 2010.). Kod risova podrijetlom iz divljine kod kojih je prisutno parenje u srodstvu zamijećen je skraćeni životni vijek (LAIKRE, 1999.).

Koeficijent križanja u bliskom srodstvu - F (engl. *fixation indeks*) govori o povećanju homozigotnosti koja nastaje kao posljedica parenja u srodstvu, odnosno izražava mogućnost da su oba alela na lokusu jedinke identična po porijeklu. Izračunava se na temelju razlika između uočene i očekivane heterozigotnosti, pod pretpostavkom da je razmnožavanje u populaciji nasumično. Vrijednosti se kreću od -1 do 1, s tim da negativan predznak označava višak heterozigota (outbreeding), kod jedinki s koeficijentom 0 nema parenja u srodstvu, dok pozitivan predznak predstavlja parenje u srodstvu (inbreeding). Npr. pri $F=0,0625$ roditelji jedinke su prvi rođaci.

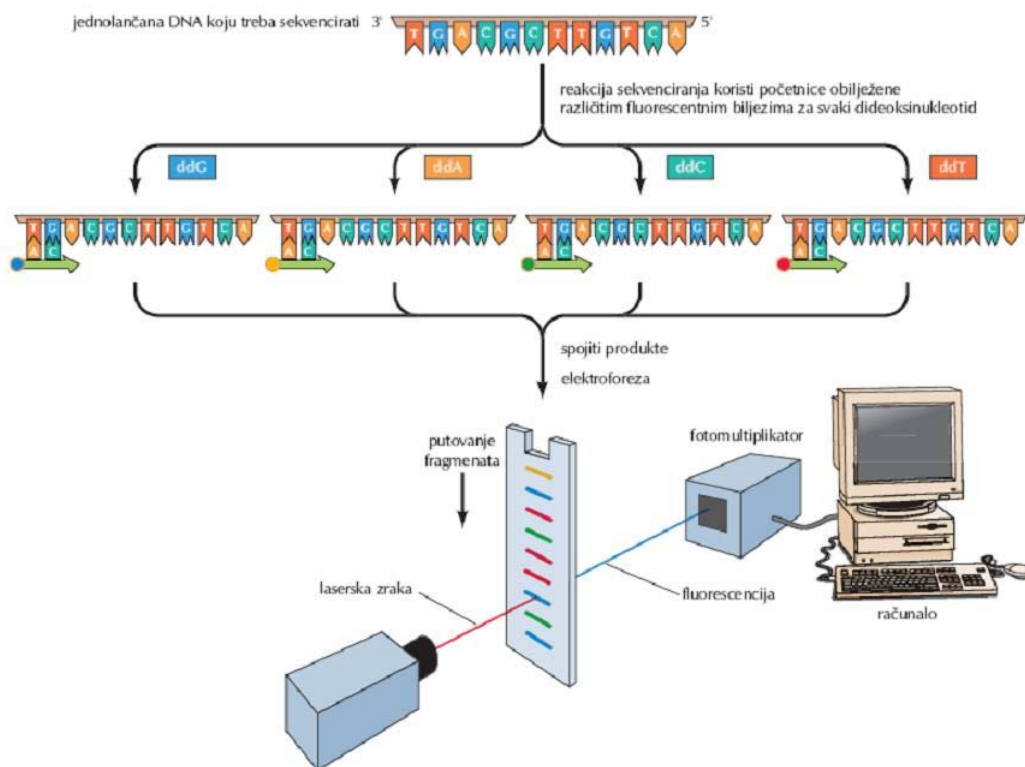
2.9 Kontrolna regija mitohondrijske DNA

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je kružna dvolančana DNA molekula koja se sastoji od 15 000 do 20 000 parova baza (pb), haploidna je, nema introna i nasljeđuje se samo od majke. Molekula se dijeli na dva osnovna dijela – kodirajući i ne-kodirajući dio. Kodirajući dio mtDNA sisavaca sadrži 37 gena, od čega 22 tRNA gena, dva ribosomalna RNA gena i 13 gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u procesima transporta elektrona i oksidativne fosforilacije (JANKE i sur., 1994.). Ne-kodirajući dio se naziva i kontrolna regija (BROWN, 1985.) ili hipervarijabilna regija (HVR), te se dijeli na HVR1 i HVR2. Kontrolna regija je mjesto u kojem započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma (CLAYTON, 1991.), te se tu očituje najveća raznolikost nukleotida i dužine sekvence u usporedbi s ostatkom mtDNA (HOELZEL i sur., 1994.). Kod kralježnjaka se u kontrolnoj regiji nalazi D-petlja (D-loop, displacement loop), trolančana struktura, po kojoj se kontrolna regija vrlo često u literaturi i naziva (TABERLET, 1996.; WHITE i sur., 1998.). Kontrolna regija se sastoji od oko 1 000 parova baza, te budući da ne kodira za sintezu proteina nije podložan prirodnoj selekciji što ju čini vrlo dobrim genetskim markerom u rješavanju filogenetskih pitanja. Najčešće mutacije u kontrolnoj regiji su točkaste mutacije (KOCHER i sur., 1989.; AVISE, 1994.). Sama mitohondrijska DNA podložna je brzom evoluciji, tako da je kod sisavaca brzina evolucije mtDNA i do 10 puta brža nego kod jezgrinih gena, a u mtDNA najbrže evoluira kontrolna regija i to 4 do 5 puta brže od ostatka mtDNA (TABERLET, 1996.; PAGE i HOLMES, 1998.). Zbog toga je mtDNA dobar marker za razlučivanje promjena na nižim taksonomskim razinama, dakle između vrsta ili populacija (ZHANG i HEWITT, 1996.). Zbog velike brzine mutacije mtDNA varijabilna je unutar prirodnih populacija, zbog čega je vrlo korisna pri istraživanjima kraćih razdoblja povijesti populacija (GALTIER i sur., 2009.).

Mutacije unutar kontrolne regije temelj su za razlikovanje haplotipova. Unutar populacija kod kojih je prisutna ravnoteža između mutacija i genetskog otklona očekivana razina genske raznolikosti neutralnih lokusa je proporcionalna efektivnoj veličini populacije, zbog čega se smatra da raznolikost mtDNA reflektira demografske događaje odnosno varijacije u veličini populacija (NABHOLZ i sur., 2007.). No budući da se mtDNA nasljeđuje samo od majke i efektivna veličina je tek četvrtina efektivne veličine nuklearne DNA, mtDNA zapravo predstavljaju reduciranu efektivnu veličinu populacije,

što znači da haplotipovi mtDNA imaju veću mogućnost izumiranja i zbog toga prilikom istraživanja možemo podcijeniti razinu genetske raznolikosti (FREELAND, 2005.).

Njene prednosti prilikom istraživanja su veliki broj kopija u stanici zbog čega se lako izolira i umnaža, te činjenica da su varijabilne regije (npr. kontrolna regija) najčešće okružene vrlo konzervativnim područjima, što olakšava sintezu početnica za njihovo umnažanje (GALTIER i sur., 2009.). Iako predstavlja tek maleni dio genoma, mtDNA najpopularniji je marker u istraživanjima genske raznolikosti u posljednjih 30 godina (GALTIER i sur., 2009.). Tek posljednjih nekoliko godina istraživanja pokazuju da su rekombinacija i pozitivna selekcija unutar mtDNA ipak moguće zbog čega treba biti oprezan prilikom interpretacije genealogija unutar iste vrste te upućuju na činjenicu da mtDNA možda ipak nije idealan marker za istraživanje genske raznolikosti (HEY, 2000.; NABHOLZ i sur., 2007.; GALTIER i sur., 2009.).



Slika 9. Automatizirano sekvenciranje DNA (izvor COOPER i HAUSMAN, 2004.).

Danas najraširenija metoda određivanja slijeda nukleotida u DNA modificirana je Sangerova dideoksi metoda (otkrivena sredinom 1970-ih) koja se temelji na prekidanju *in vitro* DNA replikacije ugradnjom dideoksinukleotida (nukleotidi koji sadrže dideoksiribozu, umjesto deoksiriboze), a uključuje cikličko ponavljanje reakcije sekvenciranja analogno lančanoj reakciji polimerazom (AVISE, 1994., HILLIS i sur. 1996.). Dvolančana DNA prvo se denaturira kako bi se dobila jednolančana za koju se zatim veže DNA početnica i dolazi do polimerazom katalizirane ugradnje nukleotida. U prisustvu deoksinukleotida (dNTP) i dideoksinukleotida (ddNTP) započinje sinteza DNA na 3' OH kraju vezane početnice i nastavlja se sve dok polimeraza ne ugradi jedan od četiri ddNTP-a. Budući da njima nedostaje OH skupina na 3' C atomu, polimeraza ne može nastaviti sintezu DNA nakon ugradnje ddNTP-a. Lančana reakcija polimerazom odvija se u takvim uvjetima da je ugradnja ddNTP-a rijedak i nasumičan događaj, a to omogućuje nastajanje fragmenata različite duljine prije no što dođe do zaustavljanja reakcije kod određenog nukleotida. Rezultat uzastopnih ciklusa denaturiranja, vezanja početnica i sinteze jest niz DNA fragmenata različite duljine koji se razdvajaju elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Nekadašnje radioaktivno obilježavanje danas ustupa mjesto fluorescentnom obilježavanju dideoksinukleotida, što uvelike pojednostavljuje postupak, jer je svaki nukleotid obilježen drugom bojom i čitavu je reakciju sekvenciranja jednog lanca DNA moguće provesti u jednoj epruveti. Detekcija tako obilježenih fragmenata obavlja se za vrijeme elektroforeze, dok DNA fragmenti prolaze ispred lasera koji pobuđuje fluorofor i detektora koji mjeri emitiranu fluorescenciju. Rezultati elektroforeze pohranjuju se u računalo u obliku kromatograma koji se zatim ručno ili pomoću računalnog programa prevodi u slijed DNA.

2.10 Mikrosatelitski lokusi

Mikrosatelitski lokusi (na engleskom se još nazivaju i simple sequence repeats – SSRs i short tandem repeats - STRs) su dijelovi jezgrine DNA u kojima se uzastopce ponavljaju od jedan do šest parova baza (Slika 10.) Na primjer slijed baza CA može se ponavljati i 40 puta za redom, što se označava $(CA)_{40}$. Broj ponavljanja rijetko prelazi 70 puta, a kod ljudi je najčešći broj ponavljanja između 2 i 50 (PAGE i HOLMES, 1998.). Nije postignut konsenzus oko najmanjeg i najvećeg broja ponavljanja koji se mogu

definirati kao mikrosateliti, te pri tome pojedini autori koriste broj ponavljanja dok drugi koriste broj parova baza (ELLEGREN, 2004.). Svaka moguća kombinacija mono-, di-, tri- i tetranukleotidnih ponavljanja izuzetno je često zastupljena u genomu, čineći gotovo 3% humanog genoma (više od milijun mikrosatelitskih lokusa) (ELLEGREN, 2004.). Najzastupljeniji su dinukleotidi, zatim mono- i tetra-, dok su trinukleotidi najrjeđi (ELLEGREN, 2004.). Kod sisavaca najčešći slijed nukleotida je GT i CA, a pojavljuje u prosjeku svakih 30 kb (kilobaza) (BRUFORD i WAYNE, 1993.; SCHLÖTTERER, 1998.). Pronađeni su u svim do sada istraživanim genomima (LI i sur., 2002.), vrlo su česti u eukariotskim stanicama iako ih ima i u prokariotskim. Poznato je da su među kralježnjacima jedino relativno rijetki u ptica (NEFF i GROSS, 2001.). Mikrosateliti čine veliki dio nekodirajuće DNA, dok ih rijetko pronalazimo u regijama koje kodiraju sintezu proteina, pa se zato smatraju evolucijski neutralnim markerima (LI i sur., 2002.). Njihova funkcija unutar molekule DNA još nije u potpunosti poznata, no istraživanja upućuju na njihovu ulogu u translaciji, transkripciji, organizaciji kromatina, rekombinaciji i staničnom ciklusu (LI i sur., 2002.).

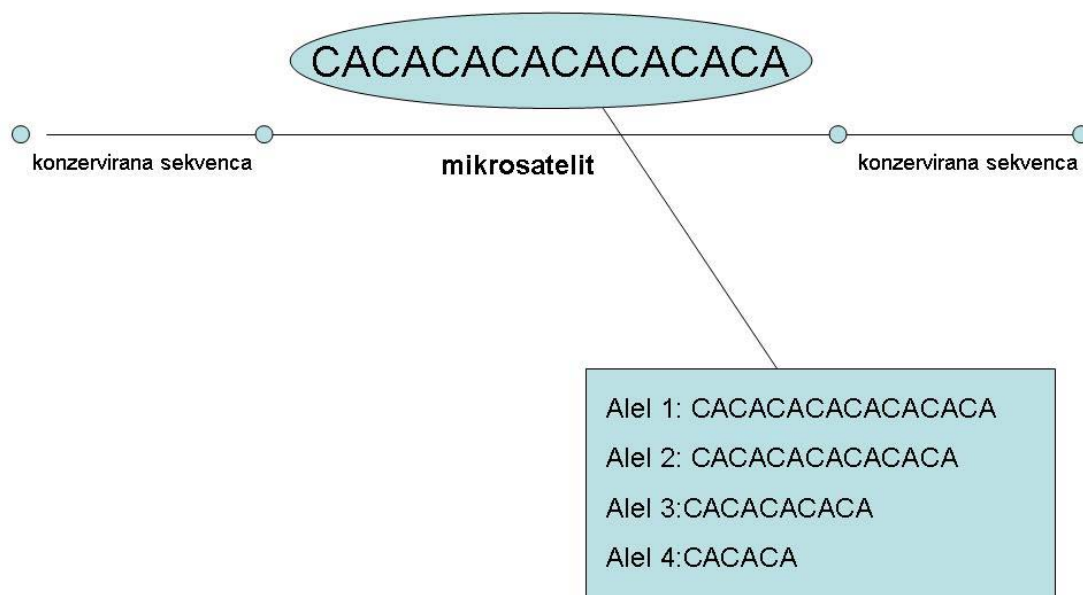
Mikrosateliti su vrlo podložni pogreškama replikacije DNA zbog čestog ponavljanja određene grupe nukleotida. Te pogreške se iskazuju kao produljenje ili skraćivanje mikrosatelita, tj. promjena broja ponavljanja grupe nukleotida, a nastaju procesom pogrešnog sparivanja skliznutog lanca (engl. slipped-strand mispairing) ili klizanje DNA (engl. DNA slippage) (MOXON i WILLS, 1999.). Klizanje DNA nastaje zbog pauziranja polimeraze i njenog odvajanja od DNA lanca. Mutacije mikrosatelitskih lokusa su vrlo česte te su oko 10^4 puta češće od točkastih mutacija. Brzina mutacije mikrosatelita iznosi od 10^{-3} do 10^{-5} mutacijskih događaja po mikrosatelitskom lokusu, po generaciji (BRUFORD i WAYNE, 1993.; MOXON i WILLS, 1999.; HANCOCK, 1999.). Mutacijski procesi mikrosatelita su kompleksni, i važno ih je poznavati prilikom pojedinih metoda statističke obrade podataka. Kao najčešći model mutacije mikrosatelita predlaže se „stepwise mutation model“ (SMM), pri čemu se dužina lokusa mijenja konstantnom brzinom prilikom replikacija, dodavanjem ili oduzimanjem jednog ponavljanja (ELLEGREN, 2004.), dok kod „infinite allele model“ (IAM) svakom mutacijom nastaje novi alel. Učestalost mutacija raste s brojem ponavljanja.

Zbog vrlo čestih mutacija mikrosateliti su jako polimorfni, te zbog nekodiranja za proteine (neutralna evolucija) i kodominantnosti (mogu se razlikovati heterozigoti od homozigota) predstavljaju izuzetno dobre genetske markere u istraživanju populacijske genetike, evolucije, identifikaciji jedinki i određivanju srodstva među jedinkama

(JEFFREYS i sur., 1985.; NAKAMURA i sur., 1987.; WEISSENBACH i sur., 1992.; FREDHOLM i WINTERØ, 1996a.; FREDHOLM i WINTERØ, 1996b.; ASHWORTH i sur., 1998.; SIGNER i sur., 1998.; KASHI i SOLLER, 1999.).

Raznolikost mikrosatelita se dakle očituje u različitom broju ponavljanja jedinica (nukleotida) što rezultira alelima različitih dužina (GOODWIN i sur., 2007.). Vrste s visokom razinom parenja u srodstvu, niskom brojnošću populacija, učestalim ili dugotrajnim pojavama uskog grla, tipično očituju niski polimorfizam i heterozigotnost, te kraće mikrosatelite (DEWOODY i AVISE, 2000.; NEFF i GROSS, 2001.)

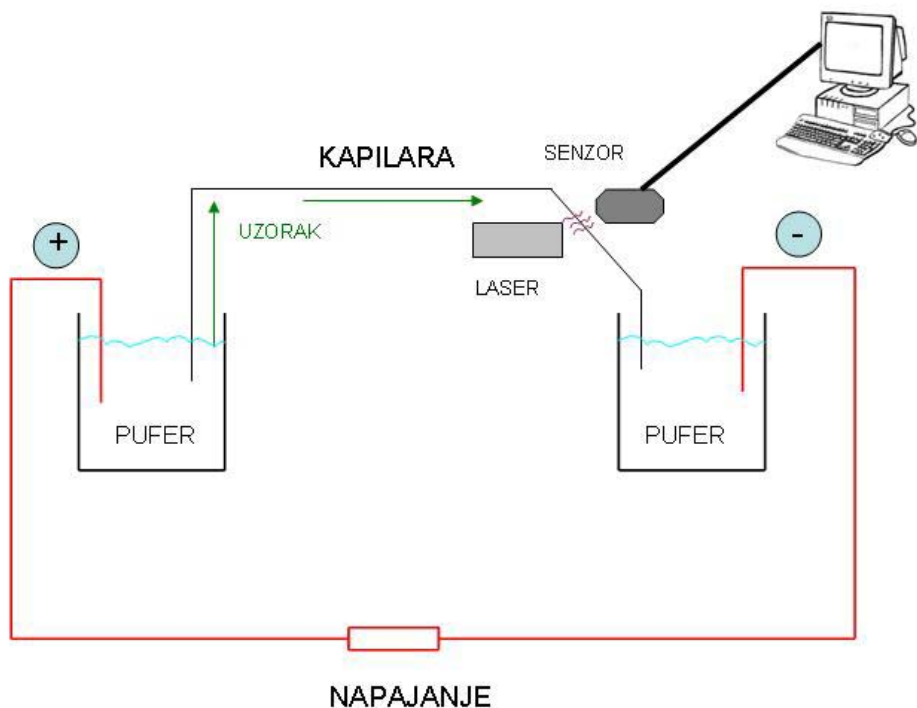
U odnosu na ostale genetske markere mikrosateliti su relativno kratki, do 500 pb, a najčešće između 50 i 150 pb, te se zbog toga mogu umnožiti iz vrlo male količine DNA (uzorci dobiveni neinvazivnim metodama) ili stare degradirane DNA (arheološki uzorci). Zbog toga se mikrosateliti često koriste kod istraživanja forenzičkih i arheoloških materijala (HAGELBERG i sur., 1991.; BRUFORD i WAYNE, 1993.) ili pak pri istraživanju uzoraka izmeta, urina, dlake, perja ili oljuštene kože teško dostupnih divljih životinja. Također, budući da su mikrosateliti (najčešće) vrsno specifični to smanjuje mogućnost kontaminacije s DNA ne-ciljanih vrsta.



Slika 10. Mikrosatelitski lokus na molekuli DNA

Duljina alela mikrosatelitskog lokusa određuje se umnažanjem određenog mikrosatelitskog lokusa pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR). PCR proizvodi

zatim se razdvajaju elektroforezom na gelu ili u kapilarama s polimerima s visokim razlučivanjem, gdje se mogu razdvojiti fragmenti koji se razlikuju u samo jednoj bazi, te se zatim određuje duljina svakom pojedinom alelu, odnosno broj opetovanih specifičnih sljedova u svakom alelu. Rezultati elektroforeze mogu se očitavati na nekoliko načina: autoradiografijom (koriste se radioaktivno označene početnice za PCR), bojanjem PCR proizvoda etidijbromidom ili srebrom, te danas najčešće korištenjem početnica označenih fluorescentnim bojama i genskih analizatora (sekvenatora). U kapilarama sekvenatora odvija se elektroforeza, pozitivno nabijene molekule DNA u polimeru (koji usporava njihovo gibanje) kreću se prema negativnoj elektrodi. Duži fragmenti se gibaju sporije od kraćih i tako se razlikuju po dužini, a za utvrđivanje dužine uspoređuju se s dužinskim standardom. Na kraju svake kapilare nalazi se laser, pod kojim početnice označene fluorescentnim bojama emitiraju određenu valnu duljinu. Senzor sekvenatora (CCD - charged coupled device camera) prepoznaje taj signal, određuje valnu duljinu i zatim šalje podatke u računalo (Slika 11.). Podatci se analiziraju pomoću programa (najčešće ABBI GenMapper™ ID) koji očitava dužinu alela na svakom lokusu i onda ih prezentira putem elektroferograma, nizom pikova koji predstavljaju različite alele. Visine alela na elektroferogramu proporcionalne su količini PCR produkta.



Slika 11. Shematski prikaz rada genskog analizatora (sekvenatora)

2.11 Molekularno određivanje spola

Kod vrsta kod kojih je spol određen spolnim kromosomima, osnova određivanja spola molekularnim metodama je postojanje ili nepostojanja određenih gena na spolnim kromosomima. Dva najučestalija pristupa određivanju spola pomoću PCR reakcije jesu umnažanje homolognih fragmenata na X i Y kromosomu te umnožavanje fragmenata specifičnih samo za Y kromosom. Kod umnažanja homologa na X i Y kromosomu koriste se geni za amelogenin, kod kojih je bitan polimorfizam veličine fragmenata (NAKAHORI i sur., 1991.) i ZFX/ZFY (eng. zinc finger) geni, kod kojih je bitno jedinstveno restrikcijsko mjesto (AASEN i MEDRANO, 1990.). Iz uzoraka dobivenih neinvazivnim putem (BRADLEY i sur., 2001.), kao i kod degradirane DNA (BÉRUBÉ i PALSBOELL, 1996.) često je teško dobiti umnažanje ZFX/ZFY fragmenata zbog njihove dužine, dok se umnažanjem kraćeg dijela fragmenta može izgubiti jedinstveno restrikcijsko mjesto (BÉRUBÉ i PALSBOELL, 1996.). Kod drugog pristupa se umnaža *sry* gen koji je specifičan za Y kromosom pa se produkt javlja samo kod mužjaka (GILSON i sur., 1998.).

2.12 Dosadašnja molekularno genetska istraživanja euroazijskog risa

Posljednjih desetak godina sve su učestalija istraživanja pripadnika roda ris pomoću metoda molekularne genetike. Iberijski ris trenutno je najugroženija mačka svijeta, budući da je vrsta prisutna samo u Španjolskoj, s oko stotinu jedinki u dvije odvojene populacije. PALOMARES i sur. (2002.) su dizajnirali vrsno specifične početnice za mtDNA za identifikaciju iberijskog risa iz izmeta. Filogenetsku i filogeografsku strukturu populacije istražili su JOHNSON i sur. (2004.), dok su PERTOLDI i sur. (2006.) istražili utjecaj pada brojnosti populacije i fragmentacije staništa na morfološka obilježja vrste. Mnoga molekularno genetska istraživanja provedena su na kanadskom risu (MILLS i sur., 2000.; CARMICHAEL i sur., 2000.; SCHWARTZ i sur., 2002.; SCHWARTZ i sur., 2003.; RUENESS i sur., 2003b.; SCHWARTZ i sur., 2004; McKELVEY i sur., 2006.; CAMPBELL i STROBECK, 2006.).

Najopsežnija istraživanja populacijske genetike euroazijskog risa do sada su provedena na skandinavskoj populaciji. Ova populacija je doživjela drastičan pad brojnosti početkom 20. stoljeća, no posljednjih desetljeća se oporavila i danas se procjenjuje na oko 2000 jedinki (LINELL i sur., 2007b.). HELLBORG i sur. (2002.) su istražili gensku raznolikost 276 uzoraka risa iz Švedske, Norveške, Finske, Estonije i Latvije. Utvrdili su da je mtDNA skandinavskih risova fiksirana, te da je prisutan samo jedan haplotip kontrolne regije. Ukupno četiri haplotipa su utvrđena u Finskoj, Estoniji i Latviji, no svi su bili vrlo slični budući da se razlikuju tek za jednu do četiri baze u regiji od 700 pb. Raznolikost mikrosatelita skandinavske populacije potvrdila je postojanje uskog grla, te slabiju raznolikost skandinavske populacije od onih u Finskoj i Baltičkim državama.

SPONG i HELLBORG (2002.) su istražili uzorke iz Švedske i Norveške na 12 mikrosatelita, i unatoč povijesnim podacima o uskom grlu Skandinavske populacije (smanjenje veličine populacije za 95 – 99%) genetski testovi nisu potvrdili znakove uskog grla na mikrosatelitnim markerima. Smatraju da je to zbog malog broja korištenih mikrosatelita, no da i unatoč velikom broju istraživanih lokusa usko grlo može ostati nezabilježeno ukoliko je trajalo kraće razdoblje.

BERLIN (2007.) je istražila upotrebu ne-invazivnih uzoraka i mikrosatelitnih markera za identifikaciju jedinki Skandinavskog risa. DALIN (2007.) je istražio polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP (engl. single nucleotide polymorphism) kontrolne regije euroazijskog risa, te upotrebu SNP i mikrosatelita u svrhu razlikovanja vrste i identifikacije jedinki.

RUENESS i sur. (2003a.) istražili su 303 uzoraka Skandinavske populacije s ciljem analiziranja uzroka i mehanizama prostorne strukture populacije koja je prošla kroz usko grlo. Točnije, htjeli su testirati hipotezu HELLBORG i sur. (2002.) da se Skandinavska populacija risa nakon uskog grla proširila iz jednog izvora. Njihovi rezultati upućuju na postojanje tri sub-populacije unutar Skandinavije, te dovode u pitanje da li je ta podjela nastala nakon ili prije uskog grla u 20. stoljeću, pobijajući hipotezu o jednom izvoru te spekulirajući o postojanju drugih populacija za vrijeme uskog grla. Ovo istraživanje dovodi u pitanje PAMILO (2004.) analizirajući rezultate RUENESS i sur. (2003a.) pomoću drugog modela. PAMILO (2004.) zaključuje da širenje populacije iz nekoliko izvora nje u potpunosti isključeno, no da je analiza kompatibilna s hipotezom širenja iz jednog izvora.

SCHMIDT i KOWALCZYK (2006.) razvili su metodu za prikupljanje uzoraka dlaka euroazijskog risa, učinkovitu za praćenje populacija niske gustoće. SCHMIDT i sur. (2009.) istražili su uzorke risa iz Poljske, Estonije i Latvije na 6 mikrosatelitskih lokusa, te nisu pronašli tragove parenja u srodstvu i uočena je veća heterozigotnost nego kod Skandinavske populacije. No rezultati ukazuju na smanjeni protok gena unutar poljske populacije, zbog čega upućuju na daljnja istraživanja te populacije i mjere zaštite. BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a., 2003b.) su istražili gotovo 500 uzoraka euroazijskog risa iz reintroductiranih (Švicarska, Francuska, Dinaridi, Bavarsko – Bohemijska) i autohtonih (Norveška, Švedska, Finska, Estonija, Latvija, Slovačka, Češka, Poljska, Rumonjska, Makedonija) populacija Europe. Svi su uzorci istraženi na 17 mikrosatelitskih lokusa. Reintroductirana populacija iz Švicarske pokazala je nižu heterozigotnost i srednji broj alela u usporedbi s karpatskom populacijom od koje potječe. Autohtone populacije imale su veći broj rijetkih alela od reintroductiranih. Reintroductirane populacije su se razlikovale od svojih izvornih populacija, osim bohemijsko – bavarske koja se vrlo malo razlikuje od izvorne karpatske. Dvije reintroductirane populacije u Švicarskoj također se međusobno razlikuju, te je veća razlika među njima i izvornom karpatskom, nego između reintroductirane dinarske i izvorne karpatske populacije. Filogenetsko stablo razdvaja tri jasne skupine (1) skandinavsku populaciju (Švedska i Norveška), (2) Finsku i Baltičke zemlje (Estonija, Latvija) te (3) populaciju u Karpatima, s iz nje proizlazećim populacijama u Dinaridima, Alpama, Jura i Vosges planinama te u Bavarskoj šumi. Iako predstavljena s tek jednim uzorkom balkanska populacija se jasno odvaja od ostalih. Genetski pomak jače se očituje u populacijama koje su začete s malim brojem jedinki (populacije u Švicarskoj i dinarska) nego u populacijama koje su imali veći broj osnivača (Bohemijsko – Bavarska i populacija u Vosges planinama).

GUGOLZ i sur. (2008.) istražili su mitohondrijsku DNA muzejskih uzoraka autohtone Alpske populacije te ih usporedili s današnjim populacijama euroazijskog risa. Među svim uzorcima pronađeno je sedam haplotipova kontrolne regije, a sva tri haplotipa autohtonog alpskog risa već su opisana u skandinavskoj, finskoj i baltičkoj populaciji. Autori predlažu postojanje pleistocenskog utočišta na jugu Europe, odakle su se risovi proširili na sjever. Autori predlažu odvojenu rutu rekolonizacije za područje Karpata ili da je čak za vrijeme Pleistocena u Karpatima postojala odvojena populacija. Zanimljivo je da su među tri uzorka balkanskog risa pronađena dva nova haplotipa, niti jedan do sada nije opisan, od čega jedan koji je jedinstven za to područje.

Istraživanje dinarske populacije, osim nekoliko uzoraka u radovima BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a., 2003b.) proveli su POLANC (2003.), u sklopu izrade diplomskog rada te kongresno priopćenje GOMERČIĆ i sur. (2006.). Oba autora istraživala su kontrolnu regiju mitohondrijske DNA, na malom broju uzoraka i kraćem slijedu te utvrdili postojanje samo jednog haplotipa.

3. Materijal i metode

3.1 Sakupljanje uzoraka

Invazivni uzorci (mišić, koža i krv) prikupljeni u Hrvatskoj potječu od lešina uginulih životinja (uzorci oznake LCRO) te od živih životinja hvatanih za radiotelemetrijska istraživanja (uzorci oznake LO). U sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva obrazovanja, znanosti i športa "Istraživanje recentnih i fosilnih velikih zvijeri u Hrvatskoj" (0053303, voditelj prof. dr. sc. Đuro Huber) te u sklopu provođenja Plana upravljanja risom u Republici Hrvatskoj prikupljane su lešine mrtvih risova radi morfoloških i patoloških istraživanja. Za vrijeme razudbe uziman je uzorak mišićnog tkiva koji je pohranjen u epruvete s 96% etilnim alkoholom. Tako uzeti uzorci su čuvani na -20°C na Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 12. Lešina risa stradalog u krivolovu (autor J. Tomaić)

U sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva obrazovanja, znanosti i športa "Istraživanje recentnih i fosilnih velikih zvijeri u Hrvatskoj" (0053303, voditelj prof. dr. sc. Đuro Huber), te u sklopu Interreg IIIA projekta „Prekogranična suradnja u upravljanju, istraživanju i zaštiti dinarske populacije risa“ hvatane su žive životinje za radiotelemetrijska istraživanja. Risovi su hvatani pomoću zamki koje fiksiraju šapu ili

pomoću kaveznih zamki, te su anestetizirane kombinacijom 0.1%-tnog medetomidina i 10%-tnog ketamina. Svaka životinja je izmjerena, opremljena telemetrijskom ogrlicom, označena mikročipom, uzeti su uzorci krvi za genetska istraživanja, a nakon obrade životinje su puštene na mjestu hvatanja. Krv je pohranjena u staklene epruvete za hematološke analize (BD Vacutainer™ K3E) u kojima se nalazio antikoagulans EDTA, te pohranjena na -20° C. Uzorci pod oznakom Ivan i Ana potječu od mladunaca risa koji su ,ostavši bez majke, zalutali u dvorište privatne kuće u Mrkoplju. Uzorak ZOO1 potječe od risa uginulog u zagrebačkom zoološkom vrtu. Suradnjom s istraživačima iz Slovenije, Slovačke te Bosne i Hercegovine prikupljeni su uzorci iz tih zemalja.



Slika 13. Risovi obilježeni radiotelemetrijskim ogrlicama Dinko, Ivek, Luna, Tisa (u smjeru kazaljke na satu) (autori M. Sindičić, V. Slijepčević, T. Gomerčić)

Prikupljeno je ukupno 40 invazivnih uzoraka iz Hrvatske (16), Slovenije (5), Slovačke (17), te Bosne i Hercegovine (2). Podatci o invazivnih uzorcima korištenim u ovom istraživanju nalaze se u Tablici 2.

Tablica 2. Popis invazivnih (mišić, krv, koža) uzoraka risa

Redni broj	Oznaka uzorka	Tip uzorka	Spol	Datum uzorkovanja	Mjesto uzorkovanja
1	L01 (Bela)	krv	Ž	16.12.2001.	Hrvatska, Crni lug, NP Risnjak
2	L03 (Ivek)	krv	M	30.11.2006.	Hrvatska, Mrkopalj
3	LO5 (Luna)	krv	Ž	07.11.2007.	Hrvatska, Begova cisterna
4	LO6 (Tisa)	mišić	Ž	07.02.2008.	Hrvatska, Škrbi vrh
5	LO7 (Dinko)	krv	M	12.02.2008.	Hrvatska, Leska, NP Risnjak
6	Ivan	koža	M	25.10.2005.	Hrvatska, Mrkopalj
7	Ana	koža	Ž	25.10.2005.	Hrvatska, Mrkopalj
8	LCRO1	mišić	Ž	10.09.1997.	Hrvatska, Oštrovica-Kikovica
9	LCRO2	mišić	Ž	06.02.1998.	Hrvatska, Škurinje, Rijeka
10	LCRO3	mišić	M	13.02.1998.	Hrvatska, Sveti Juraj, Žrnovnica
11	LCRO4	mišić	Ž	11.09.1998.	Hrvatska, Cesta Stara Sušica-Lisina
12	LCRO5	mišić	nepoznat	19.05.2004.	Hrvatska, Gornji Starigrad kod Senja
13	LCRO6	mišić	M	22.09.2005.	Hrvatska, Mošune
14	LCRO9	mišić	Ž	01.02.2009.	Hrvatska, Dimovac
15	LCRO11	mišić	Ž	10.6.2009.	Hrvatska, Debeli vrh
16	LZOO1	mišić	M	06.05.2009.	Hrvatska, Zagreb ZOO
17	SLV1	mišić	nepoznat	13.05.2008.	Slovačka
18	SLV2	mišić	nepoznat	26.05.2008.	Slovačka
19	SLV3	krv	nepoznat	28.10.2002.	Slovačka
20	SLV4	krv	nepoznat	29.10.2002.	Slovačka
21	SLV5	krv	nepoznat	30.10.2002.	Slovačka
22	SLV6	krv	nepoznat	31.10.2002.	Slovačka
23	x001	mišić	nepoznat	nepoznat	Slovačka, Bujakovo
24	x002	mišić	nepoznat	nepoznat	Slovačka, Staré Hory
25	x003	mišić	M	nepoznat	Slovačka, Laboreecká vrchovina, Stropkov
26	x006	mišić	Ž	nepoznat	Slovačka, Bojnice
27	x007	mišić	M	nepoznat	Slovačka, Chočské vrchy, Turík
28	x008	mišić	M	nepoznat	Slovačka, Kysucká vrchovina
29	x009	mišić	M	nepoznat	Slovačka, Velká Fatra, Šturec
30	x010	mišić	Ž	nepoznat	Slovačka, Vtáčnik, Jelení vrch
31	X011	mišić	Ž	nepoznat	Slovačka, Krupinská planina, Lysec
32	x012	mišić	M	nepoznat	Slovačka
33	x013	mišić	Ž	nepoznat	Slovačka
34	BIH01	mišić	nepoznat	17.10.1999.	Bosna i Hercegovina
35	BIH2	krv	nepoznat	2003.	Bosna i Hercegovina
36	6y (R48)	mišić	M	27.02.2003.	Slovenija, Vel. Gora
37	037y	koža	M	nepoznat	Slovenija, Loški potok
38	086y	mišić	Ž	23.12.2001.	Slovenija, LD Pivka
39	592y	krv	M	21.05.2005.	Slovenija, Mašun
40	R19 (85y)	mišić	nepoznat	18.09.2001.	Slovenija, LD Draga - Trava

Povijesni uzorci prikupljeni su iz trofejnih lubanja i štavljenih krzna, koji su se nalazili u privatnom vlasništvu ili su bili pohranjeni u zbirka znanstvenih institucija (Tablica 3., Slika 14.). Iz trofejnih lubanja uzet je uzorak kosti i hrskavice iz nosne šupljine (nosna pregrada i hoane), a sa štavljenih krzna je uziman uzorak mekušci te su pohranjeni u papirnatu vrećicu. Prikupljena su ukupno 93 uzorka, od čega 92 iz Hrvatske te jedan iz Bosne i Hercegovine.

Tablica 3. Popis povijesnih uzoraka euroazijskog risa iz Hrvatske

Re d. br.	Oznaka uzorka	Datum uzorkovanja	Vlasnik trofeja	Datum stradanja	Lokalitet	Spol	Tip uzorka
1	LS05	19.5.2009.	Dražen Polić, Delnice	17.1.1993.	Drgomalj	M	mekuš
2	LS05	19.5.2009.	Dražen Polić, Delnice	17.1.1993.	Drgomalj	M	lubanja
3	LS06	19.5.2009.	Dražen Polić, Delnice	4.1.1994.	izvor Kupice	Ž	lubanja
4	LS07	18.5.2009.	Zlatko Bolf, Delnice	20.9.1981.	Petehovac	Ž	mekuš
5	LS07	18.5.2009.	Zlatko Bolf, Delnice	20.9.1981.	Petehovac	Ž	lubanja
6	LS09	18.5.2009.	Zoran Pleše, Delnice	2.1.1990.	lovište Risnjak	M	mekuš
7	LS09	18.5.2009.	Zoran Pleše, Delnice	2.1.1990.	lovište Risnjak	M	lubanja
8	LS10	18.5.2009.	Zoran Pleše, Delnice	5.6.1998.	Petehovac, Dedin	M	mekuš
9	LS10	18.5.2009.	Zoran Pleše, Delnice	5.6.1998.	Petehovac, Dedin	M	lubanja
10	LS11	18.5.2009.	Ivan Volf, Delnice	28.11.1991.	Glavica	Ž	mekuš
11	LS11	18.5.2009.	Ivan Volf, Delnice	28.11.1991.	Glavica	Ž	lubanja
12	LS12	18.5.2009.	Ivan Volf, Delnice	31.1.1983.	Presika	Ž	mekuš
13	LS12	18.5.2009.	Ivan Volf, Delnice	31.1.1983.	Presika	Ž	lubanja
14	LS13	19.5.2009.	Davor Ribić, Skrad	1990.	Kupjački vrh	M	lubanja
15	LS13	19.5.2009.	Davor Ribić, Skrad	1990.	Kupjački vrh	M	mekuš
16	LS156	16.6.2009.	Milan Filipović, Novi Vinodolski	1990	Trojbukve, Ričičko bilo	M	mekuš
17	LS159	16.6.2009.	LD Jarebica Senj (lovac Zvonko Tomaić)	-	-	-	lubanja
18	LS164	16.6.2009.	Zvonko Tomaić, Senj	-	-	-	lubanja
19	LS166	16.6.2009.	Marelić Ante, Senj	1994	lovište Sv. Juraj	M	lubanja
20	LS166	16.6.2009.	Marelić Ante, Senj	1995	lovište Sv. Juraj	M	mekuš
21	LS167	17.6.2009.	Tomislav Dragičević, Čavle	1992	Platak	Ž	mekuš
22	LS168	17.6.2009.	Milutin Zoretić, Zoretići	-	-	-	mekuš
23	LS169	17.6.2009.	Đuro Šegan, Litorić	-	-	-	mekuš
24	LS21	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	1985-90	Suha Rečina		lubanja
25	LS22	19.5.2009.	Milivoj Rupe, Skrad	1984.	Rudac	Ž	lubanja
26	LS22	19.5.2009.	Milivoj Rupe, Skrad	1984.	Rudac	Ž	mekuš

27	LS23	19.5.2009.	Stjepan Štajduhar	1988.	Rudač	Ž	lubanja
28	LS23	19.5.2009.	Stjepan Štajduhar	1988.	Rudač	Ž	mekuš
29	LS24	19.5.2009.	Stjepan Štajduhar	1988.	Rudač	Ž	mekuš
30	LS24	19.5.2009.	Stjepan Štajduhar	1988.	Rudač	Ž	lubanja
31	LS26	18.5.2009.	Nikola Mamula, Gomirje	1.1.1994.	Bijela Kosa	-	lubanja
32	LS29	18.5.2009.	Tomislav Heski, Vrbovsko	4.3.1980.	Lovnik	Ž	mekuš
33	LS29	18.5.2009.	Tomislav Heski, Vrbovsko	4.3.1980.	Lovnik	Ž	lubanja
34	LS32	16.6.2009.	Mate Pavličević, Novi Vinodolski	5.4.1987.	-	Ž	lubanja
35	LS32	16.6.2009.	Mate Pavličević, Novi Vinodolski	5.4.1987.	-	Ž	mekuš
36	LS33	16.6.2009.	Ivica Butorac, Novi Vinodolski	28.2.1994.	-	Ž	lubanja
37	LS33	16.6.2009.	Ivica Butorac, Novi Vinodolski	28.2.1994.	-	Ž	mekuš
38	LS34	16.6.2009.	Ivica Mataija, Novi Vinodolski	2.2.1988.	Košutnjak, Novaljsko polje	Ž	lubanja
39	LS34	16.6.2009.	Ivica Mataija, Novi Vinodolski	2.2.1988.	Košutnjak, Novaljsko polje	Ž	mekuš
40	LS35	16.6.2009.	Stjepan Buneta, Novi Vinodolski	24.11.1985.	Košutnjak	M	lubanja
41	LS36	16.6.2009.	Boris Puhalović, Dramalj	28.2.1990.	Kanclovo	M	lubanja
42	LS38	16.6.2009.	Ivan Rubčić Brico, Novi Vinodolski	10.6.1982.	Košutnjak	Ž	lubanja
43	LS39	16.6.2009.	Goran Svetić, Novi Vinodolski	3.2.1994.	iznad Novog Vinodolskog	Ž	lubanja
44	LS43	16.6.2009.	Bogoslav Barac, Grižane	17.10.1982.	Grižane (iznad kuće)	Ž	lubanja
45	LS45	16.6.2009.	Jadranko Čor, Selce	14.2.1988.	Bribir (lovište Vepar)	M	lubanja
46	LS47	18.5.2009.	Krešimir Crnković, Brod Moravice	28.12.1986.	Okrugljak	Ž	mekuš
47	LS48	18.5.2009.	Branko Štajduhar, Brod Moravice	3.1.1992.	Okrugljak	Ž	mekuš
48	LS48	18.5.2009.	Branko Štajduhar, Brod Moravice	3.1.1992.	Okrugljak	Ž	lubanja
49	LS49	19.5.2009.	Bogdan Starčević, Fužine	1987.	Kamenita Glavica	M	mekuš
50	LS49	19.5.2009.	Bogdan Starčević, Fužine	1987.	Kamenita Glavica	M	lubanja
51	LS56	16.6.2009.	Marin Sukurica, Senj	25.7.1990.	Vučja glava, iznad Senja	Ž	lubanja
52	LS56	16.6.2009.	Marin Sukurica, Senj	25.7.1990.	Vučja glava, iznad Senja	Ž	mekuš
53	LS57	16.6.2009.	Marin Sukurica, Senj	23.8.1992.	Vučja glava, iznad Senja	M	lubanja

54	LS58	16.6.2009.	Marin Sukurica, Senj	25.6.1994.	Borov vrh, Sj. Velebit	Ž	lubanja
55	LS60	18.5.2009.	Zlatko Bolf, Delnice	25.9.1981.	Petehovac	M	mekuš
56	LS61	18.5.2009.	Marko Vujnović, Vrbovsko	-	Litorić, Lovnik	Ž	mekuš
57	LS61	18.5.2009.	Marko Vujnović, Vrbovsko	-	Litorić, Lovnik	Ž	lubanja
58	LS62	18.5.2009.	Damir Duić, Vrbovsko	1995	Bjelolasica	M	lubanja
59	LS63	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	lubanja
60	LS64	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	1995.	-	-	lubanja
61	LS65	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	1995.	Bjelolasica	-	lubanja
62	LS66	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	lubanja
63	LS67	19.5.2009.	Ivan Jakovac, Ravna Gora	1988.	lov. Bjelolasica	M	mekuš
64	LS68	19.5.2009.	Ivan Jakovac, Ravna Gora	1988.	lov. Bjelolasica	Ž	mekuš
65	LS69	19.5.2009.	Mladen Herljević, Ravna Gora	1988.	Planište	M	mekuš
66	LS69	19.5.2009.	Mladen Herljević, Ravna Gora	1988.	Planište	M	lubanja
67	LS70	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	mekuš
68	LS71	18.5.2009.	Matija Petranović, Delnice	-	-	-	mekuš
69	LS72	19.5.2009.	Željko Podobnik, Ravna Gora	1995.	Višnjevica, Jurčikov laz	M	mekuš
70	LS73	19.5.2009.	Željko Podobnik, Ravna Gora	1082.	Bjelolasica, Lončarićeva cesta		mekuš
71	LS80	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	mekuš
72	LS81	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	mekuš
73	LS82	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	mekuš
74	LS83	19.5.2009.	Tomislav Šporer, Ravna Gora	-	-	-	mekuš
75	LS84	19.5.2009.	Grgurić Miro	1982.	Kupjački vrh	Ž	lubanja
76	LS84	19.5.2009.	Grgurić Miro	1982.	Kupjački vrh	Ž	mekuš
77	LS85	19.5.2009.	Dražen Polić, Delnice	1995.	Javornik		mekuš
78	LS86	19.5.2009.	Davorin Cenčić, Lokve	1990.	Rogozno, lov. Lokve	Ž	mekuš
79	LS87	19.5.2009.	Boris Škrinjar, Fužine	1987.	Rogozno	M	mekuš
80	LS88	27.8.2009.	Marijan Malnar; Tršće	1984.	-	Ž	lubanja
81	LS88	27.8.2009.	Marijan Malnar; Tršće	1984.	-	Ž	mekuš

83	LS89	27.8.2009.	Marijan Mihelić, Tršće	1987.	-	Ž	mekuš
84	LS90	27.8.2009.	Miljenko Malnar, Vode	1992.	-	M	mekuš
85	LS91	27.8.2009.	Milivoj Klepac, Vode	1989.	-	Ž	mekuš
86	LS92	27.8.2009.	Zdenko Čop, Gerovo	1989.	Kupički vrh	Ž	mekuš
87	LS93	27.8.2009.	Zdenko Čop, Gerovo	1993.	Šegina	Ž	mekuš
88	LS94	27.8.2009.	Damir Wolf, Smrečje	1987.	iznad Smrečja	M	mekuš
89	LS95	27.8.2009.	Zdenko Lipovac, Čabar	1994.	Crna gora, Čabar	M	lubanja
90	LS95	27.8.2009.	Zdenko Lipovac, Čabar	1994.	Crna gora, Čabar	M	mekuš
91	00192	-	-	-	Hrvatska	-	preparirana koža
92	00194	-	-	-	Hrvatska	-	preparirana koža
93	BiH3	-	-	-	Bosna i Hercegovina	-	preparirana koža



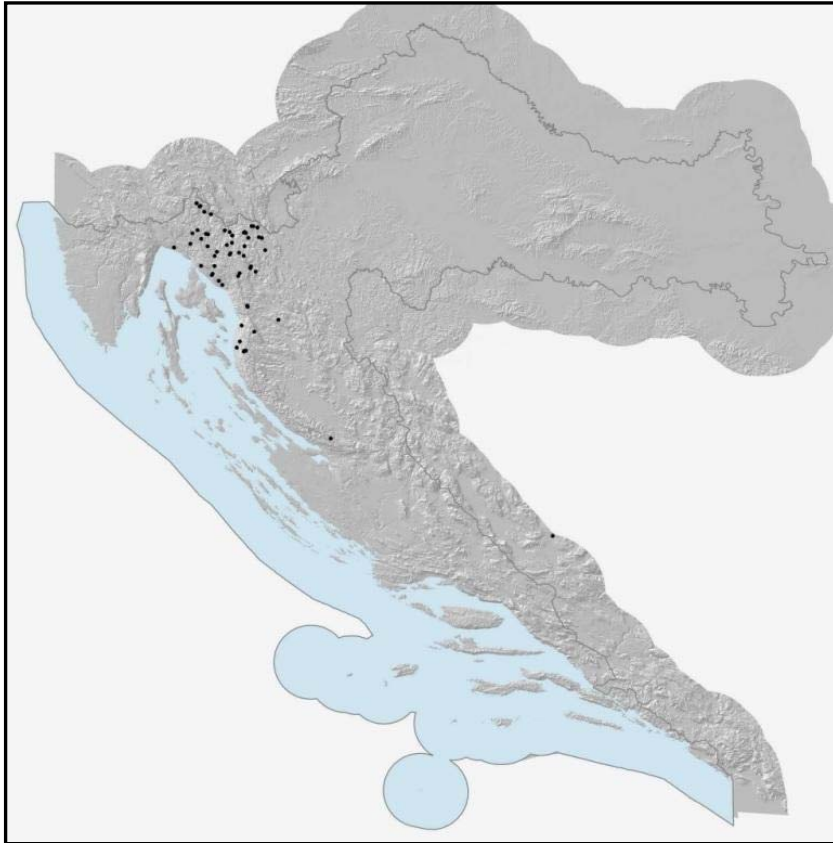
Slika 14. Trofejna lubanja i krzno LS26

Neinvazivni uzorci izmeta i dlaka prikupljeni su u Hrvatskoj u sklopu istraživanja Interreg IIIA projekta „Prekogranična suradnja u upravljanju, istraživanju i zaštiti dinarske populacije risa“ (Tablica 4.). Pri tome su korištene zamke za prikupljanje uzoraka dlake risa (SINDIČIĆ i sur., 2007.). Zamke su bile izrađene od jelovih stupića, dimenzija 5 x 3 x 110 cm. Na svaki stupić je postavljeno 40 cm bodljikave žice i dvije čičak trake, dimenzija 3 x 25 cm (Slika 15.). Mirisni mamac sastavljen je od mješavine

vazelina te eteričnog ulja biljke *Nepeta cataria* (kod nas poznata kao mačja trava ili mačja metvica). Glavna kemijska supstanca eteričnog ulja je nepetalacton, koji na mačke djeluje kao afrodizijak te izaziva psiho - seksualni efekt trljanja. Pri tome uzorak dlake biva uhvaćen žicom ili čičak trakom. Nakon testiranja u ljubljanskom zoološkom vrtu, ukupno 127 zamki je postavljeno u dvije linije, međusobne udaljenosti 400 – 500 m, pokrivajući oko 60 kilometra šumskih cesta Gorskog kotara. Postavljene su na mjestima koje risovi koriste za markiranje terena (izbočene stijene, grmlje, drveće, napuštene šumske kuće) i na putovima za koje je poznato da ih risovi koriste (podaci dobiveni telemetrijskim praćenjima i od lovočuvara). Zamke su obilježene jednom tjedno, a mamci su se obnavljali mjesečnim ritmom. Dlake, za koje se pretpostavljalo da pripadaju risu su bile pohranjene u papirnate vrećice.



Slika 15. Zamka za prikupljanje uzoraka dlaka risa (autor M. Sindičić)



Slika 16. Karta s lokacijama uzoraka prikupljenih u Hrvatskoj

Tablica 4. Popis neinvazivnih uzoraka (izmet, dlake, krv na snijegu) euroazijskog risa iz Hrvatske

RB	Oznaka uzorka	Tip uzorka	Datum uzorkovanja	Mjesto uzorkovanja
1.	JT218	izmet	04.09.2005.	Velebit
2.	ĐH200410161150	izmet	16. 10. 2004.	Leska (NPR)
3.	00170	izmet	nepoznat	nepoznat
4.	JK016 (JK200409080800)	izmet	09.08.2004	Frbežari
5.	VS200612261132	izmet	26.12.2006.	nepoznat
6.	JK017 (JK200409080801)	izmet	09.08.2004	Frbežari
7.	JT222	izmet	nepoznat	nepoznat
8.	JK019 (JK200409080803)	izmet	08.09.2004	Frbežari
9.	00169	izmet	nepoznat	nepoznat
10.	JT217	izmet	03.09.2005	Velebit
11.	JK018 (JK200409080802)	izmet	08.09.2004	Frbežari
12.	JT239	izmet	20.09.2006	Velebit
13.	JT175	izmet	22.03.2005	Velebit
14.	JT151	izmet	08.08.2004	Velebit
15.	JK020 (JK200409080804)	izmet	08.09.2004	Frbežari
16.	LH1	dlaka	05.12. 2007.	Gorski kotar
17.	LH2	dlaka	11.05.2008.	Gorski kotar
18.	LH3	dlaka	04.12.2007.	Gorski kotar
19.	LH4	dlaka	05.12.2007.	Gorski kotar
20.	LCRO13	dlaka	9.09.2009.	Južni Velebit

3.2 Izolacija DNA

DNA iz invazivnih uzoraka izolirala sam upotrebom komercijalnog kita ChargeSwitch[®] gDNA Tissue Kits, Invitrogen. Izolacija DNA rađena je prema protokolu proizvođača. Kit izolira DNA koristeći tehnologiju magnetnih kuglica, čiji površinski naboj se mijenja ovisno o otapalu (buffer) u kojem se nalazi. U otapalu niskog pH magnetne kuglice su pozitivno nabijene i privlače negativno nabijenu nukleinsku kiselinu. Proteini i ostali zagađivači otopljeni u otapalu se jednostavno uklone, dok se kuglice (na koje je privučena DNA) pomoću magnetnog stalka (MagnaRack) formiraju u čvrstu smjesu. Podizanjem pH otapala na 8.5 naboj kuglica se neutralizira i nukleinska kiselina se otpušta u otapalo.

Postupak izolacije DNA iz invazivnih uzoraka mišićnog tkiva:

1. Ukupno 3 do 5 mg tkiva mišića usitnjeno je pomoću skalpela u Petrijevoj zdjelici. Za svaki uzorak korišten je novi skalpel i nova zdjelica.
2. U sterilne, plastične epruvetice od 1,5 mL stavljeno je usitnjeno tkivo, dodano je 1 ml Lysis Mixa, vortexirano 10 do 15 sekundi, te inkubirano preko noći na 55°C.
3. Nakon inkubacije u lizirani uzorak dodano je 5 µl RNAase A i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 minuta.
4. U epruetu je dodano 200 µl ChargeSwitch[®] Purification Buffera i 40 µl ChargeSwitch[®] Magnetic Beads. Uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturi tijekom 1 minute i zatim postavljen na MagnaRack da se formira čvrsta smjesa magnetnih kuglica.
5. Pomoću pipete je uklonjen supernatant, pri čemu se trebalo paziti da se ne uznemiri formiranu smjesu magnetnih kuglica.
6. Dodano je 1 ml ChargeSwitch[®] Wash Buffera, nakon čega je uzorak opet postavljen na MagnaRack da se formira čvrsta smjesa.
7. Supernatant je uklonjen pomoću pipete i proces ispiranja je ponovljen još jednom.
8. Nakon toga uzorku je dodano 150 µl ChargeSwitch[®] Elution Buffera (10mM Tris-HCL, pH 8.5) i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 min.
9. Uzorci su zatim postavljeni na MagnaRack stalak da se formira čvrsta smjesa i supernatant u kojem se nalazi otopljena DNA je otpipetiran u sterilnu epruetu, a eprueta s magnetnim kuglicama je bačena.

Prilikom svake izolacije niza od 12 uzoraka radila sam i jednu negativnu kontrolu. Izolirana DNA je pohranjena na -20° C.

Krv je odmrznuta, promiješana okretanjem epruvete te je 20 µl krvi pipetirano na kartone za konzerviranje krvi Bloodstain Card, Whatman®. Nakon 10 minuta sušenja kartoni su usitnjeni pomoću skalpela i zatim je za izolaciju DNA korišten isti protokol kao za uzorke mišića. Prilikom svake izolacije skupine od 12 uzoraka radila sam i negativnu kontrolu. Izolirana DNA je pohranjena na -20° C.

Izolacija iz uzorka kosti i hrskavice prikupljenih iz nosne šupljine risjih lubanja napravljena je u Laboratoriju za sudsku genetiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra – Medicinski fakultet Split. DNA je izolirana modificiranim postupkom izolacije sa smjesom fenol kloroform izoamil alkohola. Prilikom svake izolacije radila se i negativna kontrola. Izolirana DNA je pohranjena na -20° C.

Postupak izolacije DNA iz povijesnih uzoraka lubanja:

1. U polipropilensku (PP) epruvetu stavi se 1 g usitnjenog uzorka kosti, doda se 3 ml izolacijskog pufera (5 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 ml 1 M NaCl; 25 ml 100 mM EDTA, pH 8,0; 2,5 ml 10% natrij dodecil sulfata (SDS) i redestilirana voda do 50 ml) i 100 µl (20 mg/ml) Proteinaze K.
2. Dobro se protrese i inkubira u vodenoj kupelji na 56 °C, 48 sati, uz protresivanje.
3. Nakon inkubacije, uzorku se doda 3 ml smjese fenol kloroform izoamil alkohol u omjeru 25:24:1, te ponovi postupak još jednom.
4. Centrifugira se 2 minute na 5000 rpm, te gornji sloj prebaci u čistu PP epruvetu.
5. Doda se 3 ml butanola, promiješa te ponovo centrifugira.
6. Odbaci se gornji sloj, a donji se prebaci u mikrokoncentrator (Amicon Centricon 100). Centrifugira se 45 minuta na 2600 rpm.
7. Odbaci se donji sloj, a u gornji sloj se dodaju 2 ml Tris-EDTA (TE) pufera (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8) ili dd H₂O. Centrifugira se 30 minuta na 2600 rpm. Ponoviti postupak dva puta.
8. Gornji dio Amicon cjevčice okrene se u obrnuti položaj i centrifugira 2 minute na 2600 rpm. Dobiveni filtrat na dnu cjevčice trebao bi sadržavati izoliranu DNA.

Izolacija iz mekuših prikupljenih sa štavljenih krzna risa napravljena je pomoću komercijalnog kita ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kits, Invitrogen, pri čemu je korišten protokol proizvođača. Prilikom svake izolacije radila se i negativna kontrola. Izolirana DNA je pohranjena na -20° C.

Postupak izolacije DNA iz povijesnih uzoraka mekuših sa štavljenih krzna:

1. Ukupno 3 do 5 mg tkiva mekuših usitnjeno je pomoću skalpela u Petrijevoj zdjelici.
2. U sterilne, plastične epruvetice od 1,5 mL stavljeno je usitnjeno tkivo, dodano je 1 ml Lysis Mixa, vortexirano 10 do 15 sekundi, te inkubirano tijekom 24 h na 55°C.
3. U epruvetu s liziranim uzorkom je dodano 200 µl ChargeSwitch® Purification Buffera i 20 µl ChargeSwitch® Magnetic Beads.
4. Nakon 1 – 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, epruveta je postavljena na MagnaRack stalak da se formira čvrsta smjesa.
5. Nakon toga pomoću pipete je uklonjen supernatant, pri čemu se trebalo paziti da se ne uznemiri formiranu smjesu magnetnih kuglica.
6. Uzorak je zatim ispran pomoću 500 µl ChargeSwitch® Wash Buffera, nakon čega je uzorak opet postavljen na MagnaRack da se formira čvrsta smjesa.
7. Supernatant je uklonjen pomoću pipete i proces ispiranja je ponovljen još jednom.
8. Nakon toga uzorku je dodano 150 µl ChargeSwitch® Elution Buffera i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 min.
9. Uzorci su zatim postavljeni na MagnaRack da se formira čvrsta smjesa i supernatant u kojem se nalazi otopljeni DNA je otpipetiran u sterilnu epruetu, a eprueta s magnetnim kuglicama je bačena.

Izolacija iz neinvazivnih uzoraka (dlake, izmet, krv na snijegu) napravljena je pomoću komercijalnog kita ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kits, Invitrogen, pri čemu je korišten protokol proizvođača, kao što je opisano kod izolacije uzoraka mekuših.

3.3 Kontrolna regija mtDNA

3.3.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Da bi dobila dovoljnu količina molekula kontrolne regije mtDNA izoliranu DNA umnožila sam lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Kod provođenja PCR-a korištene su početnice L15997 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3') (WARD i sur., 1991.) i H16498 (5' -CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3') (MEYER i sur., 1990.), kojima nastaje produkt dužine 850 parova baza.

Koristila sam liofilizirane početnice iz Invitrogen™. Prije korištenja početnice sam otopila u deioniziranoj vodi, s ciljem dobivanja temeljne (engl. stock) otopine koncentracije 100 µM, koja se može čuvati na -20° C. Za daljnje korištenje napravila sam smjesu obje početnice (10XPM), svaka u koncentracije 2 µM.

Za pripremu PCR smjese korišten je "Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen" koji sadrži:

- Taq DNA polimerazu s Platinum® Taq antitijelima
- 22 mM Tris-HCL (pH 8.4)
- 55 mM KCl
- 1.65 mM MgCl₂
- 220 µM dNTP Mix koji sadrži dGTP, dATP, dTTP, dCTP.

Umnažanje kontrolne regije mtDNA sam radila u smjesi količine 55 µL koja je sadržavala: 10 µl DNA, 5 µl otopine primera, 40 µl Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen.

PCR reakcije su provođene u plastičnim epruveticama od 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Optimizirani uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su slijedeći:

1. 92 ° - 2 min
2. 35 ciklusa: 94° - 30 sek, 48° - 30 sek, 72° - 120 sek
3. 72° - 10 min

3.3.2 Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu

Prisutnost PCR proizvoda provjeravala sam elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad, SAD) u 50 ml 1 X TBE pufera te zagrijavanjem do vrenja, sve dok se agarozna nije potpuno otopila. U agarozu je dodan SYBR Safe Gel stain 5µl. Ohlađena otopina je prelijevena u kalup te je postavljen češalj za jažice. Nakon toga se gel na sobnoj temperaturi polimerizira.

0,5X TBE pufer sadrži 0,045 M Tris-borat i 0,001 M EDTA, a dobije se razrjeđivanjem „stock“ otopine 5X TBE (koja se priređuje otapanjem 54 g Tris baze, 27,5 g borne kiseline i 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8 u destiliranoj vodi, tako da konačni volumen otopine iznosi 1l).

Iz gela je nakon polimerizacije izvučen češalj i stavljen je u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazio 1 X TBE pufer. Na parafilmu je izmiješano 5 µl PCR proizvoda i 2 µl pufera (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0,25% bromfenol plavila, 0,25% ksilencijanol fluorofosfata i 15% fikola, te nanese u gel. U prvu jažicu nanesen je biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1000 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 µg/ml, Bio-Rad, SAD). Elektroforezom je provjereno da li je došlo da umnažanja umnoženog fragmenta ili nije, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti.

Elektroforezu sam provodila na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V, a trajala je 30 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru te također fotografirani digitalnim fotoaparatom.

3.3.3 Sekvenciranje kontrolne regije mtDNA

PCR proizvode poslala sam na sekvenciranje u servis "Invitrogen", Seul, Koreja koji koristi 96-kapilarni genski analizator "ABI3730x1 DNA Analyzer", Applied Biosystems. Usuga je također uključivala pročišćavanje PCR proizvoda. Svi uzorci sekvencirani su u dva smjera. Rezultati sekvenciranja dobila sam u elektroničkom obliku i to kao PDF, AB1 i TXT datoteke. Rezultate slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA svakog pojedinog uzorka dobila sam i u obliku kromatograma.

3.3.4 Analiza rezultata sekvenciranja

Sljedove sam analizirala u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim sam izvršila višestruko sravnjenje sljedova DNA i identificirala sva polimorfna nukleotidna mjesta.

3.3.5 Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu

Za neinvazivne uzorke izmeta i dlake sam provjerila da li pripadaju euroazijskom risu tako da sam njihove sljedove unijela u internet bazu podataka GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) te sam pomoću alata BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), koji pronalazi sljedove slične slijedu kojeg sam istraživala (megablast ili nucleotide-nucleotide blast) utvrdila kojoj vrsti pripadaju.

3.3.6 Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka

GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretražila sam BLAST-om (Basic Local Alignment

Search Tool), koji pronalazi sljedove slične slijedu kojeg sam istraživala (megablast ili nucleotide-nucleotide blast).

3.3.7 Prikaz odnosa između haplotipova

Program MEGA v.4 (TAMURA i sur., 2007.) koristila sam kod provedbe filogenetske analize haplotipova istraživanih životinja.

„Kimura 2-parametra“ model (KIMURA, 1980.) koristila sam kod procjene evolucijske udaljenosti. Filogenetsko stablo rekonstruirano je „neighbor-joining“ (NJ) metodom. Na isti način provedeno je i 1000 „bootstrap“ poduzorkovanja, te dobivene „bootstrap“ vrijednosti pouzdanosti. Konačno stablo kondenzirano je kalibriranjem članaka sa „bootstrap“ vrijednostima manjim od odabranih 30%.

3.4 Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa

Iz literature sam izabrala ukupno 22 mikrosatelitna lokusa te SRY gen za određivanje spola (Tablica 5.). Početnice za umnažanje lokusa su ili vrsno specifične za euroazijskog risa (CARMICHEAL i sur., 2000.) ili su dizajnirane za druge vrste iz porodice mačaka (sumatranski tigar, domaća mačka) ali se mogu upotrebljavati kod risa budući da su sljedovi koji okružuju mikrosatelite ostali konzervirani kod srodnih vrsta (MENOTTI-RAYMOND i sur., 1999.; WILLIAMSON i sur., 2002.; BUTLER i sur., 2002.; BELLEMAIN i TABERLET, 2004.).

Tablica 5. Popis istraživanih mikrosatelitskih lokusa

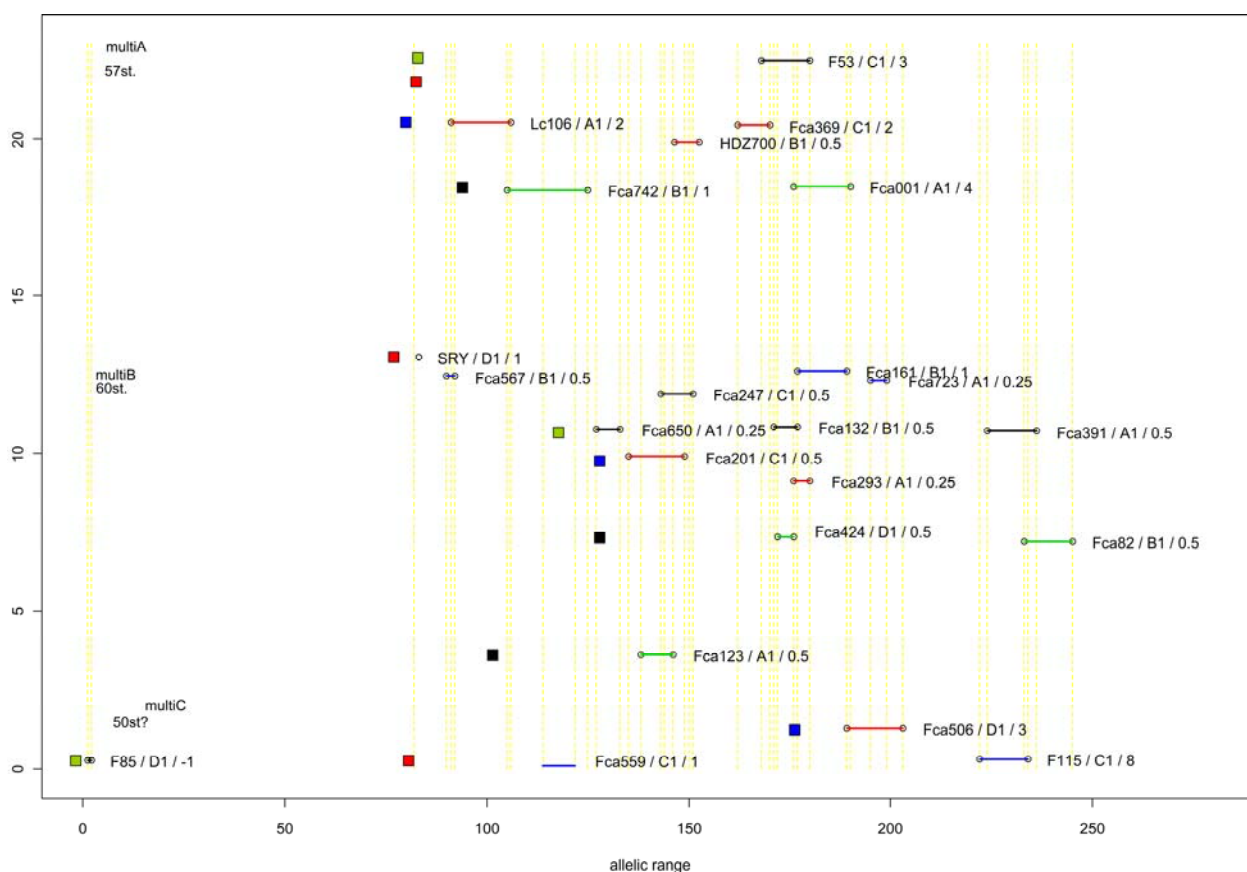
LOKUS	POČETNICA	BOJA	OČEKIVANA VELIČINA ALELA (BP)	IZVOR	GENE BANK No
Lc106	(F) TCTCCACAATAAGGTTAGC (R) GGGATCTTAAATGTTCTCA	6- FAM	96-108	CARMICHEAL i sur., 2000.	AF288054
HDZ700	(F) CCTCCTTCCAGGATGCCA (R) AGGATGGGGAAAATCTCTC	6- FAM	133-149	WILLIAMSON i sur., 2002.	AF296747
FCA201	(F) TCTGCAGGACCAGTCAGATG (R) AGCATACACAAATTGATGCTGG	6- FAM	90-169	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130563
FCA369	(F)TGAAGAGCAGAAATAGCTTCCA (R) TTTTGTGAGTTTTTGTGCAGC	6- FAM	156-184	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130623
FCA293	(F) GATGGCCCAAAGCACAC (R) CCCACATCTTGTCAACAACG	6- FAM	204	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130598
FCA506	(F) AATGACACCAAGCTGTTGTCC (R) AGAATGTTCTCTCCGCGTGT	6- FAM	182-258	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130639
FCA 650	(F)GCACATTGTGACAATACACAG (R) AGGTTTCTAGAAGGTTCCAGG	VIC	116-138	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130683
FCA247	(F) GGAAATTAGGAGCTTGCCA (R) AAGATTTACCCAGTTGCCCC	VIC	149-151	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130583
FCA132	(F) ATCAAGGCCAACTGTCCG (R) GATGCCTCATTAGAAAAATGGC	VIC	137-152	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130535
F85	(F) TCTGGTCTCAGTTTTTCCT (R) ATGTCTGTATGAGATGCGGT	VIC	175-311	BUTLER i sur., 2002.	AY988120
FCA391	(F) GCCTTCTAACTTCTTGCAGA (R) TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA	VIC	129-273	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130624
F53	(F) GTTGGGAGTAGAGATCACCT (R) GAAAAAGACTCCTGCTTGCA	VIC	288-344	BUTLER i sur., 2002.	AY988119
FCA742	(F) TCAATGTCTTGCACAACGCATAA (R) AGGATTGCATGACCAGGAAC	NED	122-175	BUTLER i sur., 2002.	AY988143
FCA001	(F) TGCTTGTCTCTCCCTCG (R) TGACTGCGCCATAGCTTTC	NED	190-212	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130472
FCA82	(F) TCCCTTGGGACTAACCTGTG (R) AAGGTGTGAAGCTTCCGAAA	NED	239-246	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF339955
FCA123	(F) ACTGCGAGAGGACTTTCGAA (R) CTTCTGACAGGCTCCAGGTT	NED	137-149	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130530
FCA424	(F)TGGAAAAATGTGGAATACTGAA (R) CCAATTTGTAGTGACATCCCC	NED	159-187	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130625
FCA 567	(F) TCAGGGTTTTCCAGAGAAACA (R) TAGACACATACAGATGGGGTGC	PET	92-106	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130661
FCA559	(F) GCCAAAATGTTCAAGAGTGG (R) TTTTGGCTTGATGAGCATCA	PET	113-195	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130659
FCA161	(F) TTACCGATACACACCTGCCA (R) CACAGACGTGCTTAGCCAA	PET	179-187	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AF130549

F115	(F) CTCACACAAGTAACTCTTTG (R) CCTTCCAGATTAAGATGAGA	PET	193-217	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AY988109
FCA723	(F) TGAAGGCTAAGGCACGATAGA (R) CGGAAAGATACAGGAAGGTA	PET	243-317	MENOTTI- RAYMOND i sur., 1999.	AY988124
SRY	(F) GAACGCATTCTTGGTGTGGTC (R) TGATCTCTGAGTTTGCATTG			BELLEMAIN i TABERLET, 2004.	

F (forward) označuje početnice koje se vežu na 5' kraju matrice lanca DNA, a R (reverse) označuje početnice koje se vežu na 3' kraju lanca. Jedna od početnica za svaki lokus označena je fluorescentnom bojom, koje se kovalentno vežu na 5' kraju početnice. Upotrijebila sam pet boja (najviše moguće): 6-FAM (plava), VIC (zelena), NED (žuta) PET (crvena) i LIZ (narančasta). Duljinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems) koji se dodaje PCR produktima, označen je s LIZ.

3.4.1 Optimizacija lančane reakcije polimerazom

Cilj optimizacije jest definirati multiplekse, odnosno skupine mikrosatelitskih lokusa koji se mogu umnožiti u zajedničkoj PCR reakciji. Pojedinačno umnažanje svakog lokusa u posebnoj reakciji dugotrajan je i preskup proces. Prilikom združivanja mikrosatelitnih lokusa u multiplekse potrebno je paziti na dužinski raspon (engl. allelic range) svakog lokusa tako da se fragmenti lokusa koji su obojani istom bojom međusobno ne pokrivaju (Slika 16.), te da se lokusi unutar istog multipleksa optimalno umnažaju na istoj temperaturi. Također je potrebno paziti na razmjere među koncentracijama pojedinih početnica zbog međusobne kompetitivnosti i stvaranja dimera početnica (engl. primer dimers) - kao nusproizvod PCR reakcije molekule početnica se spajaju (hibridiziraju) komplementarnim bazama na 3' kraju lanca, DNA polimeraza ih amplificira te time koči amplifikaciju ciljane molekule DNA.



Slika 16. Dužinski rasponi svih analiziranih lokusa

Također, cilj optimizacije mi je bio utvrditi protokol pomoću kojeg se na elektroferogramu dobiju približno jednake visine alela na svakom lokusu. Problem koji se javlja prilikom analiziranja rezultata na elektroferogramu jesu tzv. pull up-i, pojava kada zbog velike količine početnica i kvalitetne DNA nastane velika količina PCR produkta, što se onda na elektroferogramu očituje kao vrlo visoki alel koji probija i u susjednu boju te otežava definiranje alela. Taj problem se rješava prilagođavanjem koncentracije početnica i brojeva ciklusa umnažanja čime se postiže ravnoteža između visina alela. Još jedna pogreška koja se javlja prilikom PCR amplifikacije mikrosatelita in vitro, a otežava tumačenje rezultata na elektroferogramu, je isklizavanje lanca prilikom replikacije (engl. replication slippage) a očituje se sa „stutter bands“ – produktima koji se razlikuju u broju ponavljanja (1, 2 ili 3 ponavljanja su kraći), što se na elektroferogramu vidi kao jednako udaljeni pikovi padajuće visine lijevo od alela.

Procesom optimizacije dobiva se optimalni PCR protokol kojim se umanjuju greške. Izvor grešaka kod sekvenciranja mikrosatelita su pogreške amplifikacije, pogrešno tumačenje artefakata (pull up-ova, stutter band-ova) kao alela, kontaminacija,

pogrešno označavanje uzoraka ili pogrešan unos podataka o uzorku (BONNIN i sur. 2004). Pogreške koje se javljaju kod amplifikacije su nul aleli (engl. allelic dropout) i lažni aleli (engl. false alleles), koji nastaju kao posljedica stohastične greške kod pipetiranja i amplifikacije. Nul aleli se najčešće javljaju kod amplifikacije malih količina DNA, pa se stohastično jedan alel umnoži više nego drugi tj. jedan alel se uopće ne umnoži. Tada imamo pojavu da se heterozigot očituje kao lažni homozigot. Suprotno kod pojave lažnih alela homozigot se interpretira kao heterozigot ili se kod heterozigota očituje pojava trećeg alela.

Proces optimizacija odvija se tako da se na temelju teoretske optimalne temperature umnažanja mikrosatelitskih lokusa, dužina fragmenta i boje kojom su označeni lokusi rasporede u multiplekse, te se zatim testiraju PCR reakcije na temperaturnim gradijentima (raspon između najviše i najniže potencijalne temperature na kojoj se umnažaju lokusi) i s različitim koncentracijama početnica da bi se utvrdili optimalni uvjeti umnažanja svakog mikrosatelitnog lokusa.

3.4.2 Lančana reakcija polimerazom

Budući da prilikom obrade velikog broja uzoraka može doći do pogreške zbog ljudskog faktora (zamjena uzoraka, pogreške prilikom pipetiranja) utvrdila sam sistem laboratorijskog rada kojim se preveniraju takve pogreške. Pripremljen je protokol za rad u Excel formatu u koje se unosi broj uzoraka koji se analizira. Program automatski izračunavaju potrebni volumeni svih kemikalija i početnica te prikazuje prostorni raspored uzoraka na ploči. Protokol se ispunjava prije obrade svake skupine uzoraka, rade se dvostruke provjere oznaka i rasporeda uzoraka te je ovim načinom rada osigurana preciznost i smanjena mogućnost pogreške (Tablica 6.).

Tablica 6. Primjer protokola u Excel formatu za pripremu PCR reakcije

MPA_ris_C	BI.L_281110				
Number samples	105	tubes (+10 %)	Date : 28.11.2010.		
DNA	1	μl	Person: Magda		
Volume PCR	10	μl			
			UHQ water	231	μl □
Qiagen Mastermix	2	×	Quaigen Mastermix	525	μl □
Q solution 5×	0,5	×	Q solution	105	μl □
Fca 559 (20uM)F	0,20	μM	Fca 559 (20uM)F	10,50	μl □
Fca 559 (20uM)F	0,20	μM	Fca 559 (20uM)F	10,50	μl □
Fca123 (20uM)F	0,40	μM	Fca123 (20uM)F	21,00	μl □
Fca123 (20uM)F	0,40	μM	Fca123 (20uM)F	21,00	μl □
F115 (20uM)F	0,20	μM	F115 (20uM)F	10,50	μl □
F115 (20uM)F	0,20	μM	F115 (20uM)F	10,50	μl □
Fca001 (20uM)R	0,40	μM	Fca001 (20uM)R	21,00	μl □
Fca001 (20uM)F	0,40	μM	Fca001 (20uM)F	21,00	μl □
Lc106/AF054 (20uM)F	0,40	μM	Lc106 (20uM)F	21,00	μl □
Lc106/AF054 (20uM)R	0,40	μM	Lc106 (20uM)R	21,00	μl □
PCR :			Volume Mastermix Total	945	μl
Initial denaturation	95°C	15 min	Volume of PCR mix/tube	9	μl
Number of cycles :	52				
Denaturation :	94°C	30 sec	V / multichanel dist.	109,7	μl
Annealing:	53.8°	90 sec			
Elongation :	72°C	1 min			
Final Elongation	60°C	30 min			

Tablica 6. Nastavak

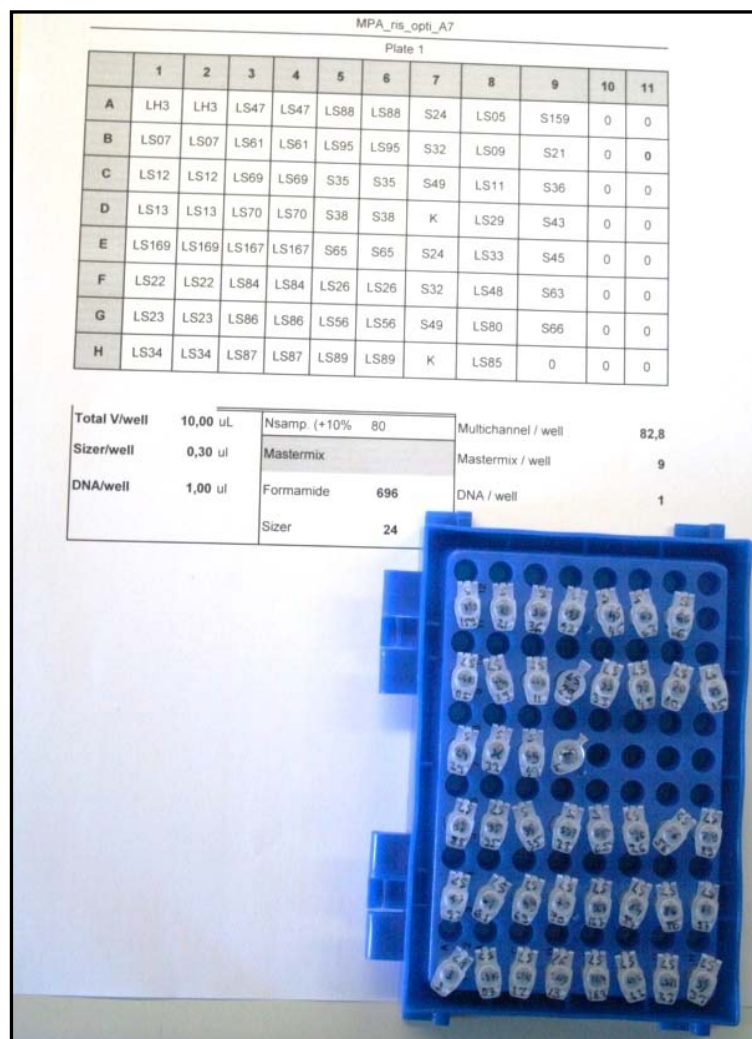
MPA_ris_A

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LS15 6	LS90	LS15 6	LS90	LS156	LS90	LS15 6	LS9 0	LS15 6	LS9 0	LS15 6	LS9 0
B	LS16 6	LS73	LS16 6	LS73	LS166	LS73	LS16 6	LS7 3	LS16 6	LS7 3	K	LS7 3
C	LS47	S06	LS47	S06	LS47	S06	LS47	S06	LS47	S06	LS47	S06
D	LS82	S21	LS82	S21	LS82	S21	LS82	S21	LS82	S21	LS82	S21
E	LS67	S26	LS67	S26	LS67	S26	LS67	S26	LS67	S26	LS67	S26
F	LS33	S36	LS33	S36	LS33	S36	LS33	S36	LS33	S36	LS33	S36
G	LS48	S57	LS48	S57	LS48	S57	LS48	S57	LS48	S57	LS48	S57
H	LS92	S58	LS92	S58	LS92	S58	LS92	S58	LS92	S58	LS92	S58

Total	10,0		Nsamp.	105	Multichann	108,
V/well	0	uL	(+10%):		el / well	7
Sizer/we	0,30	ul	Mastermix		Mastermix /	9
II					well	
DNA/wel	1,00	ul	Formamid	913,	DNA / well	1
I			e	5		
			Sizer	31,5		

Pipetiranje sam vršila s osam-kanalnom pipetom a prije toga su uzorci raspoređeni prema protokolu fotografirani (Slika 17.) pri čemu se eliminira mogućnost zamjene uzoraka. Na svakoj PCR ploči od 92 uzorka rađene su i dvije negativne kontrole.



Slika 17. Priprema uzoraka za PCR reakciju, uzorci se za pipetiranje pripremaju prema protokolu i fotografiraju

Pripremu PCR reakcije za invazivne i neinvazivne (povijesne) uzorke vršila sam u odvojenim laboratorijima, te se pri tome primjenjivao vrlo strog protokol prilikom ulaska u laboratorij - ulazak u neinvazivni laboratorij bio je zabranjen ukoliko je osoba prije boravila u invazivnom laboratoriju ili PCR sobi, a da se prethodno nije tuširala i promijenila odjeću. Priprema PCR reakcija u neinvazivnom laboratoriju provodila se unutar PCR kabineta.



Slika 18. Priprema uzoraka za PCR reakciju u laboratoriju za neinvazivne uzorke Biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani

PCR reakcija se odvijala u Eppendorf MasterCycler EP Gradient po protokolu koji je određen za svaki multipleks (Tablica 7.). Protokol za invazivne i neinvazivne (povijesne) uzorke razlikuje se u broju ciklusa. Kod invazivnih uzoraka broj ciklusa je 36 za sva tri multipleksa, dok sam neinvazivne uzorke umnažala na većem broju ciklusa (MP A 50 ciklusa, MP B i C na 52 ciklusa). Budući da je DNA u neinvazivnim i povijesnim uzorcima prisutna u manjim količinama i lošije je kvalitete zbog degradacije tijekom godina i npr. obrade lubanja kuhanjem i kemikalijama, potrebno je bilo prilagoditi protokol genotipizacije. Kod uzoraka s lošijom kvalitetom DNA najčešće se javlja pad uspjeha amplifikacije proporcionalno dužini lokusa, odnosno kraći lokusi se previše amplificiraju dok se najduži lokusi gotovo uopće ne amplificiraju (GOODWIN i sur., 2007). Zbog toga se češće javljaju pogreške prilikom tumačenja rezultata.

Ukupni volumen PCR reakcije iznosio je 10 μ l, a osim 1 μ l DNA sadržavao je i odgovarajuću količinu vode, MasterMix-a (Qiagen Multiplex PCR kit) i Q solution-a (otopina koja sadrži nukleotide, puffer, Taq polimerazu, mono- i divalentne katione).

Tablica 7. Multipleksi A, B i C za PCR reakciju neinvazivnih uzoraka

Multi A		Multi B		Multi C	
Početnice	Koncentracija (μM)	Početnice	Koncentracija (μM)	Početnice	Koncentracija (μM)
F53 F & F53 R	0.28	Fca567 F & Fca567 R	0.12	Fca 559 F & Fca 559 R	0.20
Fca161 F & Fca161 R	0.30	Fca247 F & Fca247 R	0.18	Fca123 F & Fca123 R	0.40
Lc106 F & Lc106 R	0.40	Fca723 F & Fca723 R	0.22	F115 F & F115 R	0.20
Fca369 F & Fca369 R	0.28	Fca650 F & Fca650 R	0.10	Fca001 F & Fca001 R	0.40
HDZ700 F & HDZ700 R	0.20	Fca132 F & Fca132 R	0.10	Lc106 F & Lc106 R	0.40
		Fca391 F & Fca391 R	0.40		
		Fca201 F & Fca201 R	0.10		
		Fca293 F & Fca293 R	0.10		
		Fca82 F & Fca82 R	0.15		
		Fca424 F & Fca424 R	0.40		
PCR protokol		PCR protokol		PCR protokol	
95°C	15 min	95°C	15 min	95°C	15 min
52 ciklusa		52 ciklusa		52 ciklusa	
94°C	30 sec	94°C	30 sec	94°C	30 sec
57°C	90 sec	60°C	90 sec	53,8°C	90 sec
72°C	60 sec	72°C	60 sec	72°C	60 sec
60°C	30 min	60°C	30 min	60°C	30 min

3.4.3 Genotipizacija

Ukupno 1 μl PCR produkta svakog uzorka pomiješala sam s 9 μl mješavine formamida (deionizirani formamid denaturira DNA) (Applied Biosystems) i dužinskog standarda GS500-Liz (Applied Biosystems). Zatim sam uzorke podvrgla denaturaciji u Eppendorf MasterCycler EP Gradient tijekom 4 minute na 95° C i potom ohladila na ledu. Denaturacijom sam osigurala da su svi PCR produkti u obliku jednolančanih molekula. Dužine alela mikrosatelitnih lokusa određene su pomoću 16 – kapilarnog sekvenatora ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) Biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani.

Za analizu elektroferograma (ispis sekvenatora) upotrijebila sam program GeneMapper (Applied Biosystems). Svaki elektroferogram je osim mene pregledala najmanje još jedna osoba, da bi se izbjegle sve greške. Kod neinvazivnih uzoraka svaki

alel sam morala potvrditi najmanje dva puta da bih ga uvrstila u genotip. Analiza uzoraka ponavljana je dok nisu utvrđeni sigurni genotipovi, a ukoliko to nije postignuto nakon 8 ponavljanja uzorak nije uvršten u daljnju analizu.



Slika 19. Elektroferogram uzorka LCRO3, multipleks B

Za ocjenu pogreške nasumično sam ponovila 10% svih genotipizacija, kao što preporučuju BONIN i sur. (2004).

3.5 Statistička analiza genotipova

3.5.1 Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Računalni program GENALEX 6 (PEAKALL i SMOUSE, 2006.) koristila sam za izračun ukupnog broja alela, raznolikost alela (broj alela po lokusu), frekvenciju alela (ukupni udio alela u populaciji), broj efektivnih alela i koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F , engl. inbreeding coefficient, fixation index). Broj efektivnih alela je mjera koja govori o potrebnom broju jednako frekventnih alela da bi se postigla određena genska raznolikost, odnosno to je mjera pomoću koje možemo uspoređivati populacije u

kojima se frekvencija i distribucija alela drastično razlikuje, tj možemo uspoređivati populacije koje imaju jednaki ukupan broj alela no s različitom distribucijom. Što je heterozigotnost veća efektivni broj alela će biti veći, dok je efektivni broj alela najniži kada samo jedan alel dominira frekvencijom dok su svi ostali vrlo rijetki (WEIR, 1990).

Računalni program Arlequin (EXCOFFIER i sur., 2005.) koristila sam za procjenu uočene heterozigotnosti (H_O) i očekivane heterozigotnosti (H_E), te za testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) pri čemu je korišten Markov chain test te 1 000 000 ponavljanja.

Računalni program Fstat (GOUDET, 2001.) koristila sam za izračun alelnog bogatstva (engl. allelic richness) što je mjera broja alela po lokusu neovisno o veličini uzorka, te za izračun F-statistike odnosno mjere F_{is} koja govori o deficitu heterozigota unutar populacije.

3.5.2 Vjerojatnost identifikacije jedinke upotrebom mikrosatelitskih lokusa

Računalnim programom Gimlet (VALIČRE, 2002.) izračunala sam statističku vjerojatnost identifikacije (IP) pojedine jedinke euroazijskog risa temeljem svakog od 20 analiziranih lokusa zasebno. Vjerojatnost identifikacije jedinke je jedan od najčešćih statističkih metoda kojom se ocjenjuje kvaliteta i mogućnost pojedinih molekularnih markera, kao što su mikrosateliti, za razlikovanje jedinki međusobno. Dobivene vrijednosti za pojedine lokuse govore kolika je vjerojatnost da na temelju samo tog lokusa raspoznamo pojedine jedinke od ostalih u populaciji. Korištenjem više mikrosatelitski lokusa povećavamo vjerojatnost razlikovanja budući se njihove vrijednosti umnažaju.

3.5.3 Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck)

Program „Bottleneck, A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data“ (CORNUET i LUIKART, 1996.) koristila sam za procjenu prolaska populacije risa iz Hrvatske kroz „usko grlo“ efektivne veličine svoje populacije.

U populacijama koje su nedavno prošle kroz „usko grlo“, genska raznolikost (H_E) je manja od genske raznolikosti koja se očekuje pod pretpostavkom da je populacija bila konstantne veličine. Kažemo da je populacija u ravnoteži između mutacija i genetičkog drifta (H_{EQ}). Program Bottleneck uspoređuje te dvije genske raznolikosti, a H_{EQ} računa iz uočenog broja alela po različitim modelima mutacija - modelu beskonačnog broja alela (IAM, engl. Infinite Allele Model), modelu postupnih mutacija (SMM, engl. Stepwise Mutation Model) i dvofaznom modelu (TPM, engl. Two-Phase Model). Model beskonačnog broja alela (IAM) pretpostavlja da svakom mutacijom nastaje novi alel (KIMURA i CROW, 1964.). Model postupnih mutacija (SMM) pretpostavlja da novi aleli nastaju dobitkom ili gubitkom jedne ponavljajuće jedinice, odnosno mikrosatelitskog motiva (OHTA i KIMURA, 1973.). Dvofazni model (TPM) pretpostavlja da većina mutacija slijedi SMM, ali dozvoljava i određeni postotak promjena po modelu IAM (DI RIENZO i sur., 1994.). S obzirom da malo mikrosatelitskih lokusa strogo slijedi SMM model, autori preporučuju koristiti TPM model (DI RIENZO i sur., 1994.), te sam isti i primijenila i to pod pretpostavkom da postoji 70% (TPM-70) i 95% (TPM-95) postupnih mutacija.

Kako bi utvrdila da li u istraživanoj populaciji postoji značajan višak heterozigota po svim lokusima izabrala sam Wilcoxonov test zbroja rangova.

3.5.4 Procjena postojanja subpopulacija

Procjenu postojanja subpopulacija (postojanje strukturiranja unutar populacije) napravila sam pomoću programa Structure 2.2 (FALUSH i sur., 2003.; EVANNO i sur., 2005.). Model korišten u programu pretpostavlja postojanje određenog broja subpopulacija koje su karakterizirane određenom grupom frekvencije alela, no pri tome ne može sam odrediti koliko subpopulacija postoji već je potrebno postaviti preduvjete za različiti broj subpopulacija. Parametre koje sam koristila u programu su: "Length of Burnin Period" 10000, "Number of MCMC Reps after Burnin" 10000. Za procjenu postojanja subpopulacija među svim analiziranim uzorcima (Hrvatska, Slovačka, Bosna i Hercegovina) koristila sam model "Admixture" s pretpostavkom postojanja četiri subpopulacije, dok sam kod analize postojanja subpopulacija samo među uzorcima iz Hrvatske te Bosne i Hercegovine koristila model "Admixture" s pretpostavkom postojanja dvije subpopulacije.

4. Rezultati

4.1 Izolacija DNA

Prikupljena su ukupno 153 uzorka euroazijskog risa, od toga 128 uzoraka iz Hrvatske, 17 iz Slovačke, 5 iz Slovenije, te 3 iz Bosne i Hercegovine. Prikupljeno je 40 invazivnih uzorka – 27 uzoraka mišića uginulih životinja, 10 uzoraka krvi životinja uhvaćenih za radiotelemetrijska istraživanja, 2 uzorka vrha uške životinja uhvaćenih za radiotelemetrijska istraživanja (radilo se o mladuncima pa je vađenje krvi bilo vrlo teško izvedivo), te jedan uzorak kože uginule životinje. Od ta 34 invazivna uzorka ukupno 16 uzoraka je iz Hrvatske, 17 iz Slovačke, 5 iz Slovenije te 2 iz Bosne i Hercegovine. Prikupljeno je 20 neinvazivnih uzoraka iz Hrvatske – 15 izmeta i 5 dlaka; ukupno 92 povijesna uzorka iz Hrvatske – 49 uzoraka mekuših sa štavljenih trofejnih krzna, 41 uzorak lubanja, te 2 uzorka kože sa štavljenih trofejnih krzna. Prikupljen je jedan neinvazivni uzorak (koža sa štavljenog trofejnog krzna) iz Bosne i Hercegovine. Važno je naglasiti da ukupno 93 povijesna uzorka predstavljaju 70 različitih jedinki budući je za 23 jedinke prikupljen i uzorak lubanje i uzorak mekuših. Tako da je od 18 jedinki prikupljen samo uzorak lubanje, od 26 jedinki samo mekuših, od 3 samo preparirana koža, a od 23 jedinke i uzorak lubanje i uzorak mekuših.

DNA je izolirana iz ukupno 153 uzoraka koji pripadaju 130 različitih jedinki (za 23 jedinke prikupljen je uzorak hrskavice i mekuših) (Tablica 8.).

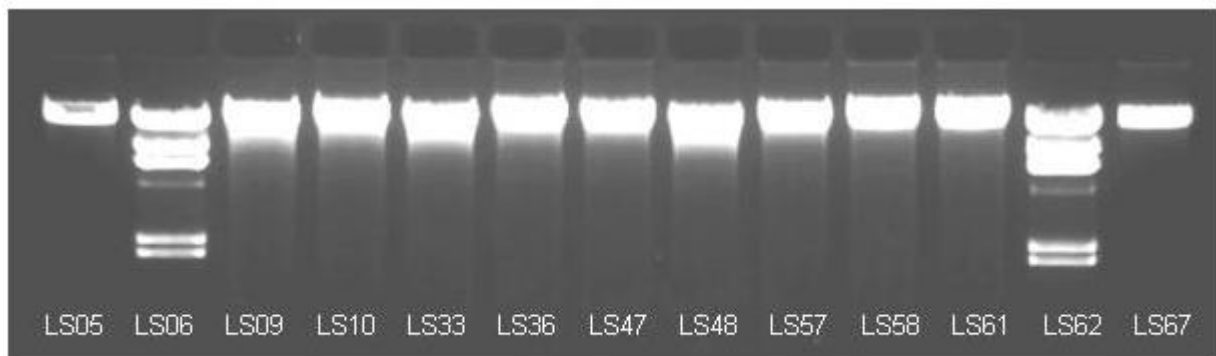
Tablica 8. Prikaz tipova i broja uzoraka iz kojih je izolirana DNA

	TIP UZORKA	BROJ UZORAKA
NEINVAZIVNI UZORCI	izmet	15
	dlaka	5
POVIJESNI UZORCI	mekuš	49
	lubanja	41
	preparirana koža	3
INVAZIVNI UZORCI	mišić	27
	krv	10
	uho	2
	koža	1
UKUPNO		153

4.2 Kontrolna regija mitohondrijske DNA

4.2.1 Uspješnost umnažanja i sekvenciranja kontrolne regije

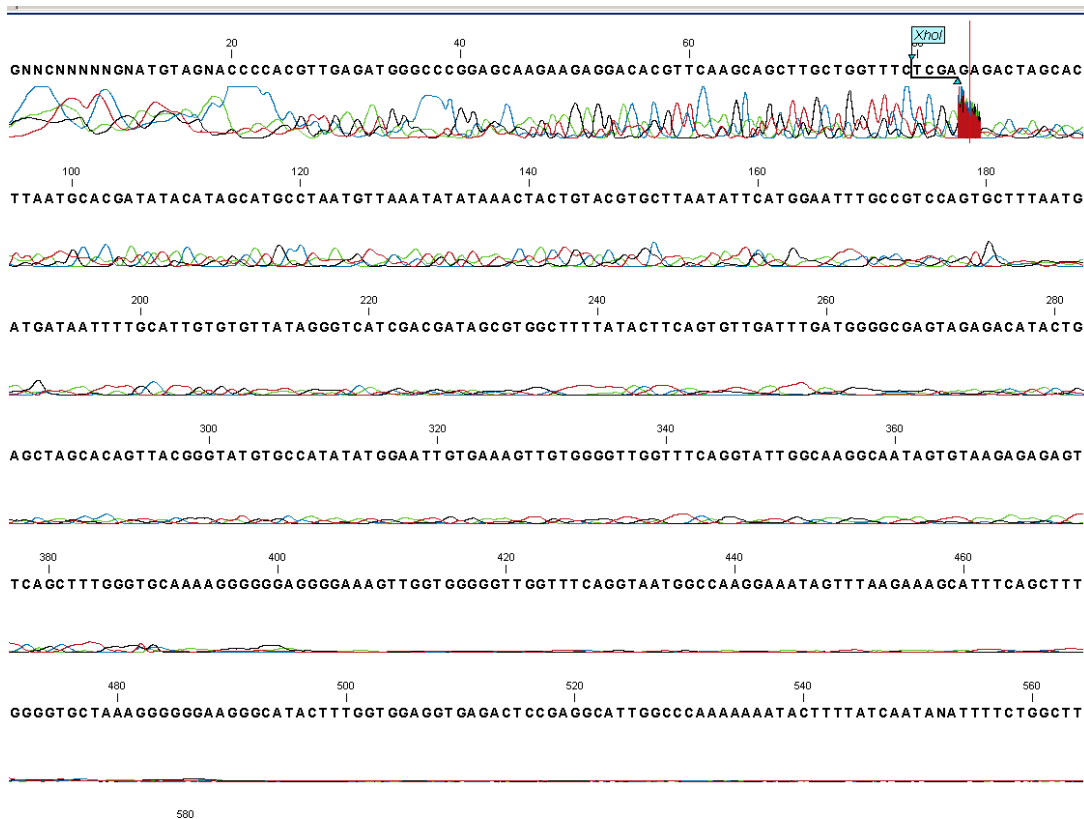
Umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNA (PCR reakcija) provela sam koristeći početnice L15997 (WARD i sur., 1991.) i H16498 (MEYER i sur., 1990.), kojima nastaje produkt dužine 850 parova baza. Uspješnost umnažanja kontrolne regije mitohondrijske DNA provjerila sam elektroforezom na gelu (Slika 20.).



Slika 20. Provjera uspješnosti umnažanja kontrolne regije elektroforezom na gelu. Kod uzoraka LS06 i LS62 umnažanje nije uspješno (dobivene su nespecifične sekvence različitih dužina) i uzorci nisu poslani na sekvenciranje.

PCR reakcija je provedena za uzorke koji predstavljaju 124 različitih jedinki (6 uzoraka iz Slovačke nije bilo uključeno u istraživanje mtDNA). Za 23 jedinke kod kojih su prikupljeni uzorci i hrskavice i mekušci, PCR reakcija je prvo napravljena za uzorak mekušci (budući da je iz mekušci izoliran veći volumen DNA) te ako PCR mekušci nije uspio napravljen je PCR uzorka lubanje. Kod 13 uzoraka kontrolna regija nije uspješno umnožena ni za uzorak mekušci ni za uzorak lubanje. Kod 9 uzoraka kontrolna regija je umnožena iz uzorka mekušci, te samo kod jednog uzorka iz lubanje. Tako da je ukupno napravljeno 137 PCR reakcija. Od toga je za ukupno 48 reakcija (35.0%) elektroforeza na gelu pokazala negativan rezultat, tj. kontrolna regija nije uspješno umnožena (nije dobiven nikakav PCR produkt ili su dobivene nespecifične sekvence različitih dužina). PCR produkti ukupno 89 uzoraka (jedinke) sadržavali su umnoženu kontrolnu regiju i

poslani su na sekvenciranje. Od toga je kod 10 uzoraka kvaliteta umnožene kontrolne regije bila loša (Slika 21.), sekvenciranje nije uspjelo te nisam dobila rezultate sekvenciranja. Dobiveno je ukupno 79 sljedova (sekvenci) kontrolne regije mitohondrijske DNA koje su analizirane pomoću kompjuterskih programa. Sljedovi ukupno 36 uzoraka nisu bili dovoljne kvalitete te su isključeni iz daljnjih analiza.



Slika 21. Kromatogram uzorka čiji sljed je bio nedovoljne kvalitete i nije uključen u daljnju analizu.

4.2.2 Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu

Prije daljnjih analiza za uzorke izmeta i dlake sam provjerila da li pripadaju euroazijskom risu, budući prilikom njihovog prikupljanja na terenu to nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi na temelju morfoloških obilježja. Od 15 uzoraka izmeta, kod 3 uzorka kvaliteta umnožene kontrolne regije je bila loša, te sekvenciranje nije uspjelo. Od preostalih 12 uzoraka sljedova kontrolne regije pretragom GenBank baze podataka utvrdila sam da su dva uzorka pripadala euroazijskom risu, dva vuku (*Canis lupus*),

sedam lisicama (*Vulpes vulpes*), i jedan uzorak je pripadao europskoj krtici (*Talpa europea*).

Od 5 prikupljenih uzoraka dlaka, slijed kontrolne regije 1 dlaka pripadao je jelenu običnom (*Cervus elaphus*), ostale risu.

4.2.3 Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA

Od ukupno 124 uzorka različitih jedinki uključenih u istraživanje mtDNA euroazijskog risa analizirani su sljedovi kontrolne regije ukupno 32 uzorka (25.8%) (kod 35 uzoraka kontrolna regija nije umnožena, kod 10 uzoraka kvaliteta umnožene kontrolne regije je bila loša i sekvenciranje nije uspjelo, kod 36 uzoraka dobiveni slijed je bio nedovoljne kvalitete da ga se uključi u analizu te kod 11 uzoraka slijed nije pripadao risu).

Kontrolna regija sekvencirana je iz lijevog i desnog smjera (H i L) tako da sam za svaki uzorak dobila dva slijeda dužine 850 pb, što je omogućilo veću pouzdanost podataka. Lijevi i desni slijed sam spojila, te ukoliko su postojala nepoklapanja u pojedinim bazama ispravnost sam provjerila na kromatogramu (Slika 22.). Kod 20 uzoraka kvaliteta jednog od sljedova nije bila dobra te sam za poravnavanje koristila samo jedan od sljedova (naravno onaj kvalitetniji).

Kod 32 uzorka poravnala sam sljedove duge 675 parova baza jer početni odnosno završni dio slijeda nije bio dovoljne kvalitete da ga se uključi u analizu.

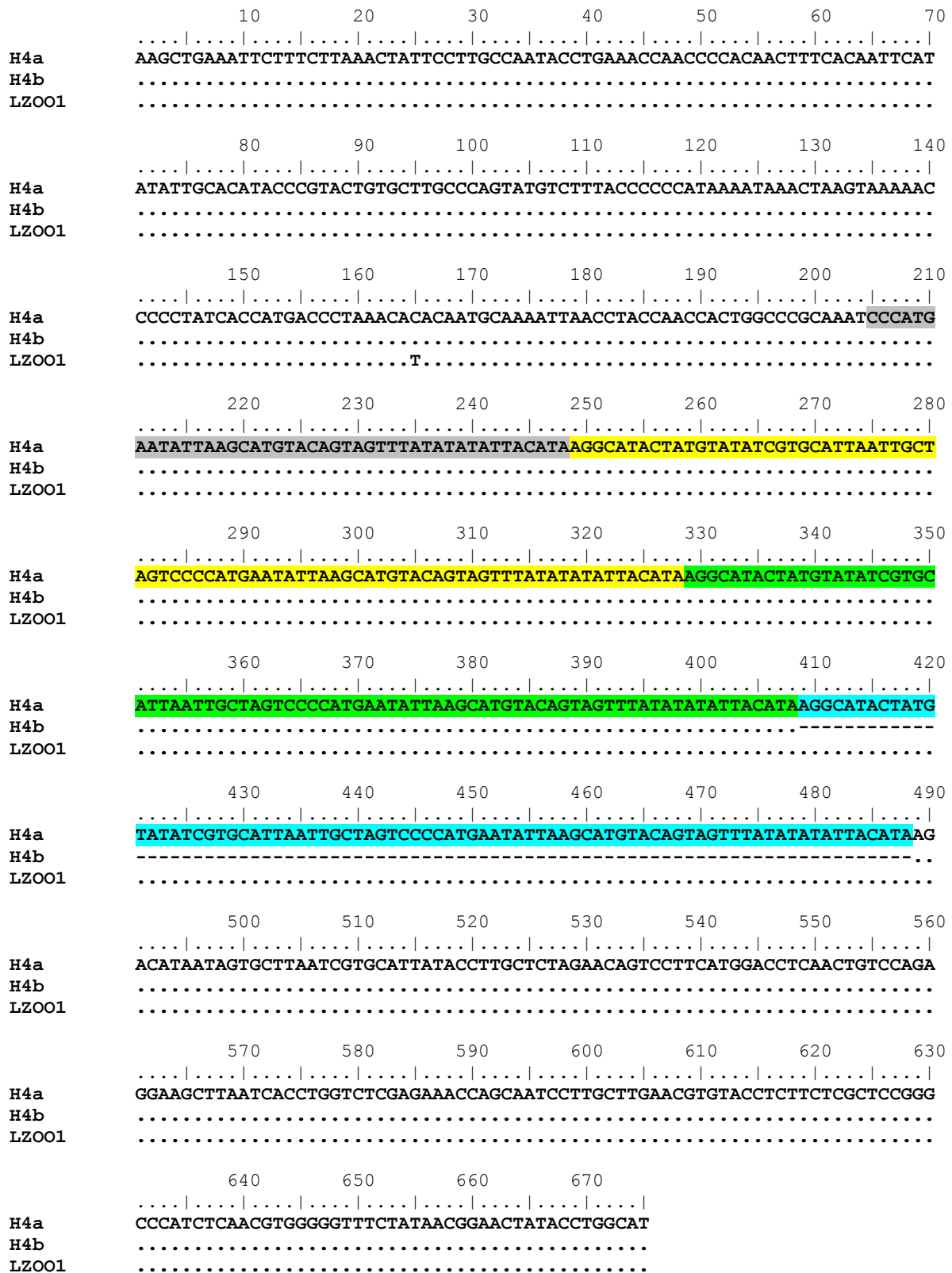


Slika 22. Dio kromatograma uzorka LCRO03 kojem su uspješno spojene sekvence iz oba smjera koje su se u potpunosti podudarale.

4.2.4 Raznolikost slijedova kontrolne regije

Utvdila sam da svi analizirani uzorci slobodno žujućih životinja iz Hrvatske (N=18), Slovačke (N=6), Slovenije (N=5) i Bosne i Hercegovine (N=2) pripadaju istom haplotipu koji sam označila kao H4 (H4 je oznaka za taj haplotip korištena u prethodnim radovima), no da postoje dvije varijante tog haplotipa. Unutar slijeda sam identificirala ponavljajuću sekvencu dužine 80 pb, koja se ponavlja 3,5 puta (3 ponavljanja od 80 pb i jedno ponavljanje 44 pb). No kod 8 (25%) od 32 analizirana uzorka sekvenca se ponavlja 2.5 puta, odnosno jedno ponavljanje od 80 pb nedostaje. Haplotipove sam označila kao H4a (ponavljajuća sekvenca prisutna 3,5 puta) te H4b (ponavljajuća sekvenca prisutna 2,5 puta).

Uzorak euroazijskog risa iz Zagrebačkog zoološkog vrta pripadao je drugom haplotipu koji se razlikovao u jednoj bazi, na poziciji 165 C je supstituiran s T. Haplotip sam označila kao LZOO1.



Slika 23. Slijed nukleotida haplotipa H4a, H4b i LZOO1. Točkice označuju iste nukleotide kao kod H4a, a crtice delecije. Žutom, zelenom i plavom bojom je označeni su prvo, drugo i treće ponavljanje sekvence od 80 pb, a sivom četvrto ponavljanje od 44 pb.

Tablica 9. Oznaka, tip, zemlja podrijetla i haplotip uzoraka kod kojih je analiziran slijed dužine 675 pb

	Oznaka uzorka	Tip uzorka	Zemlja podrijetla	Haplotip
1	L01	krv	Hrvatska	H4a
2	L03	krv	Hrvatska	H4a
3	L05	krv	Hrvatska	H4a
4	L06	mišić	Hrvatska	H4a
5	L07	krv	Hrvatska	H4b
6	IVAN	uho	Hrvatska	H4b
7	ANA	uho	Hrvatska	H4a
8	LCRO1	mišić	Hrvatska	H4b
9	LCRO2	mišić	Hrvatska	H4a
10	LCRO3	mišić	Hrvatska	H4a
11	LCRO4	mišić	Hrvatska	H4a
12	LCRO5	mišić	Hrvatska	H4a
13	LCRO6	mišić	Hrvatska	H4a
14	LCRO9	mišić	Hrvatska	H4a
15	LCRO11	mišić	Hrvatska	H4a
16	LCRO13	dlaka	Hrvatska	H4b
17	LH3	dlaka	Hrvatska	H4a
18	LH4	dlaka	Hrvatska	H4a
19	BiH1	mišić	Bosna i Hercegovina	H4b
20	BiH2	krv	Bosna i Hercegovina	H4a
21	R19	mišić	Slovenija	H4a
22	6Y	mišić	Slovenija	H4a
23	037Y	koža	Slovenija	H4a
24	086Y	mišić	Slovenija	H4a
25	592Y	krv	Slovenija	H4b
26	SLV1	mišić	Slovačka	H4a
27	SLV2	mišić	Slovačka	H4a
28	SLV3	krv	Slovačka ZOO	H4b
29	SLV5	krv	Slovačka ZOO	H4a
30	SLV6	krv	Slovačka ZOO	H4b

31	x008	mišić	Slovačka	H4a
32	LZOO1	mišić	Zagreb ZOO	LZOO1

4.2.5 Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka

Pretraživanjem računalne baze podataka NCBI - GenBank pronašla sam kontrolne regije mitohondrijske DNA euroazijskog risa iz ostalih istraživanja. U GenBank bazi podataka pohranjeno je ukupno 55 sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNA euroazijskog risa, od toga 48 sljedova autora RUENESS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) koji nisu objavljeni u znanstvenoj publikaciji, nije poznato podrijetlo uzorka i stoga nisu uključeni u daljnje analize, 4 slijeda HELLBORG i sur. (2002.) te 3 slijeda GUGOLZ i sur. (2008.).

Poravnavala sam 7 sljedova za koje je poznato podrijetlo sa sljedovima dobivenim u ovom istraživanju u dužini od 300 pb. HELLBORG i sur. (2002.) analizirali su 700 parova baza kontrolne regije, dok su GUGOLZ i sur. (2002.) analizirali dva odvojena fragmenta kontrolne regije, dužine 157 pb i 143 pb, među kojima se nalazi ponavljajuća sekvenca, tako da sam poravnala te podudarajuće fragmente svih devet haplotipova.

Utvdila sam da se haplotip pronađen u ovom istraživanju među uzorcima iz Hrvatske, Slovačke, Slovenije te Bosne i Hercegovine podudara s haplotipom pohranjenim u bazi pod rednim brojem AY034816. Taj su haplotip prvi opisali HELLBORG i sur. (2002.) na uzorcima iz Baltičkih zemalja i označili ga kao H4, te ga zatim potvrdili GUGOLZ i sur. (2008.) na uzorcima iz Karpata te iz reintroducirane Švicarske populacije.

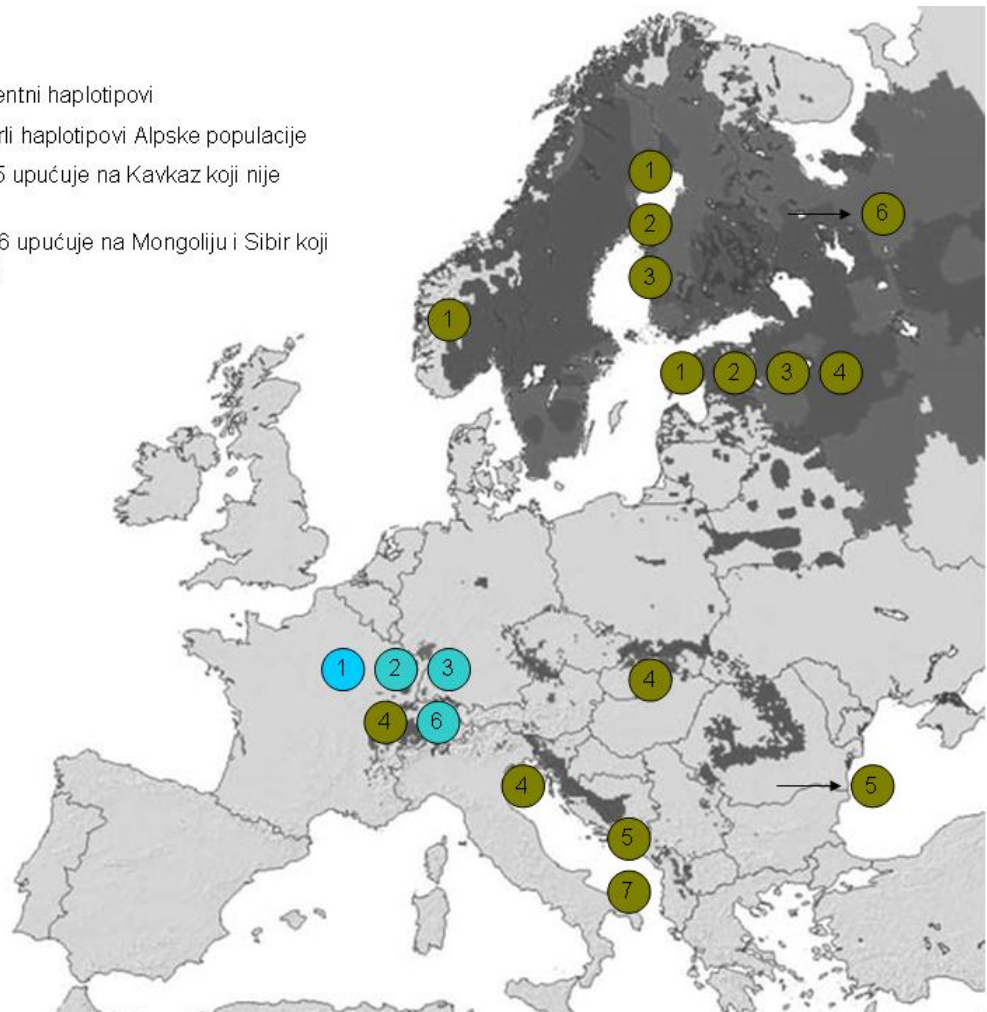
Haplotip ZOO1 nije se poklapao s niti jednim od pohranjenih haplotipova.

Tablica 10. Pregled do sada istraženih haplotipova euroazijskog risa

Oznaka haplotipa	GenBank br.	Lokacija i autor
H1	AY034813	Skandinavija, Finska, Baltik (HELLBORG i sur., 2002.) izumrla alpska populacija (GUGOLZ i sur., 2008.)
H2	AY034814	Finska, Baltik (HELLBORG i sur., 2002.) izumrla alpska populacija (GUGOLZ i sur., 2008.)
H3	AY034815	Finska, Baltik (HELLBORG i sur., 2002.) izumrla alpska populacija (GUGOLZ i sur., 2008.)
H4	AY034816	Baltik (HELLBORG i sur., 2002.) Karpati, reintroducirana alpska populacija (GUGOLZ i sur., 2008.) Reintroducirana dinarska populacija, Karpati (ovo istraživanje)
H5	EU107389	balkanska populacija, Kavkaz (GUGOLZ i sur., 2008.)
H6	EU107390	izumrla alpska populacija, Mongolija, Sibir (GUGOLZ i sur., 2008.)
H7	EU107391	balkanska populacija (GUGOLZ i sur., 2008.)

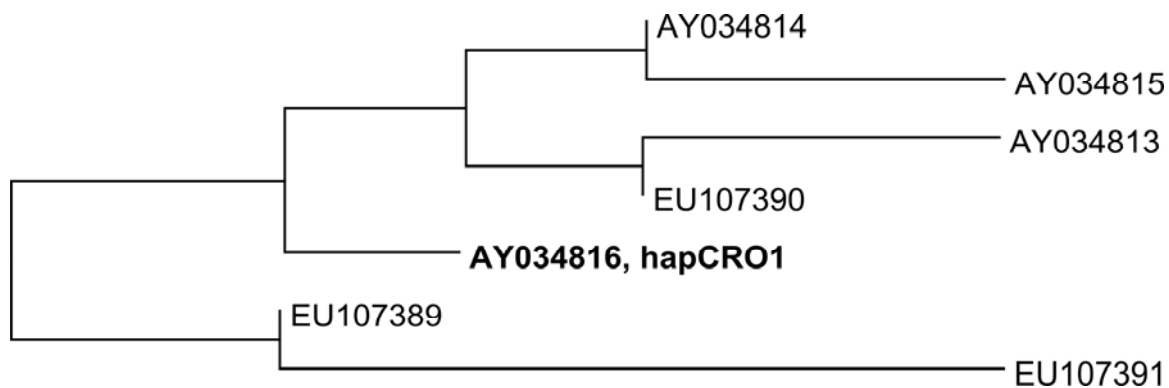
Legenda:

- Zeleni krugovi – recentni haplotipovi
- Plavi krugovi – izumrli haplotipovi Alpske populacije
- Strelica uz haplotip 5 upućuje na Kavkaz koji nije prikazan na karti
- Strjelica uz haplotip 6 upućuje na Mongoliju i Sibir koji nisu prikazani na karti



Slika 24. Karta Europe s prikazom lokacija do sada istraženih haplotipova euroazijskog risa, oznake haplotipova podudaraju se s oznaka iz Tablice 10.

Na slici 25. prikazano je genealoško stablo, dobiveno programom Mega 4, koje prikazuje filogenetske odnose sedam haplotipova registriranih u GenBank bazi podataka (navedeni pod brojem iz baze) i haplotipa utvrđenog u Hrvatskoj. Vidljivo je da je haplotip iz ovog istraživanja identičan haplotipu AY034816. Vidljivo je da se haplotipovi EU107389 (H5) i EU107391 (H7) pronađeni na Balkanu i Kavkazu odvajaju od ostalih.



Slika 25. Genealoško stablo sedam haplotipova registriranih u GenBank bazi podataka (navedeni pod brojem iz baze) i haplotipa pronađenog u ovom istraživanju (hapCRO1).

4.3 Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa

Nakon optimizacije umnažanja svih 22 lokusa i SRY gena, utvrdila sam tri multipleksa (MP A, B, C) s optimalnim koncentracijama svake početnice, te optimalnim brojem ciklusa i temperaturom PCR reakcije za invazivne i neinvazivne (povijesne) uzorke. Tijekom optimizacije utvrdila sam da mikrosatelitni lokusi F85 i Fca506 imaju vrlo nisku uspješnost umnažanja te sam ih isključila iz daljnjeg istraživanja. Istraživanje je provedeno na 20 mikrosatelitskih lokusa i SRY genu za određivanje spola.

4.3.1 Uspješnost genotipizacije mikrosatelitskih lokusa

Genotipizacija je provedena na ukupno 133 uzoraka euroazijskog risa, od toga 115 uzoraka iz Hrvatske, 16 uzoraka iz Slovačke, te 2 uzorka iz Bosne i Hercegovine. Uzorci iz Slovenije nisu bili uključeni u istraživanje mikrosatelitskih lokusa. Za 23 jedinke kod kojih su prikupljeni uzorci i hrskavice i mekušci, genotipizacija je prvo napravljena za uzorak mekušci (budući da je iz mekušci izoliran veći volumen DNA) te ako genotipizacija nije uspjela postupak je napravljen na uzorku hrskavice. Kod 15 uzoraka genotipizacija je uspjela na uzorku mekušci; kod 4 uzorka genotipizacija nije uspjela na uzorku mekušci, a

uspjela je na uzorku hrskavice, te kod 4 uzorka genotipizacija nije uspjela niti na uzorku mekušci niti na uzorku hrskavice.

Uspješno sam genotipizirala ukupno 79 uzoraka euroazijskog risa, od toga 60 uzoraka iz Hrvatske, 1 uzorak risa iz zagrebačkog ZOO-a, 16 uzoraka iz Slovačke, te 2 uzorka iz Bosne i Hercegovine. Od ukupno 79 uzoraka 34 su bili invazivni, a 45 povijesni uzorci. Genotipizacija neinvazivnih uzoraka te uzoraka preparirane kože nije uspjela. Ukupna uspješnost genotipizacije je iznosila 59.4%, a uspješnost genotipizacije pojedinih tipova uzoraka prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Uspješnost genotipizacije pojedinih tipova uzoraka

	TIP UZORKA	BROJ ANALIZIRANIH UZORAKA	BROJ GENOTIPIZIRANIH UZORAKA	%
NEINVAZIVNI UZORCI	izmet	15	0	0
	dlaka	5	0	0
POVIJESNI UZORCI	mekuš	49	30	61,2
	lubanja	26	15	57,7
	preparirana koža	3	0	0
INVAZIVNI UZORCI	mišić	23	23	100
	krv	9	9	100
	uho	2	2	100
UKUPNO		133	80	

Uspješnost genotipizacije po pojedinom lokusu prikazana je u Tablici 12. Najveću uspješnost genotipizacije imao je lokus Fca567 (100%), a najmanju lokusi Fca391 i Fca82 (74,68%).

Tablica 12. Uspješnost genotipizacije pojedinog lokusa

Lokus	Broj uspješno genotipiziranih uzoraka	%
F53	71	89,87
Fca161	70	88,61
Fca369	74	93,67
HDZ700	77	97,47
Fca742	74	93,67
Fca132	72	91,14
Fca201	76	96,20
Fca247	76	96,20
Fca293	73	92,41
Lc106	77	97,47
Fca391	59	74,68
Fca424	62	78,48
Fca650	76	96,20
Fca567	79	100,00
Fca82	59	74,68
Fca723	74	93,67
F115	69	87,34
Fca123	77	97,47
Fca559	75	94,94
Fca001	71	89,87

4.3.2 Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke

Genotipovi euroazijskog risa iz Hrvatske, Slovačke te Bosne i Hercegovine prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Genotipovi euroazijskog risa iz Hrvatske, Slovačke te Bosne i Hercegovine

	F53		Fca161		Fca369		HDZ700		Fca742		Fca132		Fca201		Fca247		Fca293		Lc106	
LS05	175		178	188	162	166	143		105	121	171	177	133	135	147	149	174		100	106
LS10	175		182		162	166	147		109	125	171	177	139	147	143	147	176		100	106
LS166	167	175	178	182	162		143	149	109	125	177		135	139	143	149	174	176	106	
LS169	175		178	182	166		147	147	105		171		133		147		174	176	100	106
LS23	175		178		166		147		109		171		133	147	143	147	174	176	100	
LS07	175		178	182	166		143	147	125		171		133		149		174		100	106
LS09	171	175			166		149		121		171		135		143	149			90	100
LS11	175				162	166	147	149	105	125			135	139	149		174	176	100	106
LS156	167						143												100	106
LS22	175		182		162	166	143	147	105		171	177	133		147		176		106	
LS26			178	182	162	166	143	147	109	121		177	133	139	143	149	174	176	100	106
LS29	167	175	178		166		147		105		171		135	147	143	149	174		90	106
LS33	175		182		162	166	143	147	121	125	171	177	133		143	147	176		106	
LS47	175		178	182	162	166	143	147	109		171	177	133		147	149	176		100	106
LS48	175	179	182	188	162	166	143		105	125	171	177	133	139	143	149	174	176	90	106
LS61	175						147		125				133		147				106	
LS67	175		178		162	166	143	147	105		171	177	135		143		174	176	100	106
LS68	175		178	182	162	166	143		109	125	171	177	133	147	143	147	176		90	106
LS69	167	175	178		162	166	147	149	121		171	177	139		147	149	174		100	106
LS70	167	175	178		162	166	143	147	109	125	171	177	133	135	143	149	174	176	100	106
LS72	175		178	182	166		143	147	105	121	171		133	135	147	149	174	176	106	
LS73	175		178	182	162	166	143	147	105		171	177	133		147	149	176		100	106
LS81	175		178		162		143	147	105	125	171	177	135		143	149	174		106	
LS82	167	175	178	182	166		143	147	109		171	177	133	135	143	147	174		106	
LS85			178	182	166		143	147	109	125	171		133	147	143	149	174	176	90	106
LS86	175		182	188	166		143	147	109	125	171		133		147	149	174	176	106	
LS88	167	175	178	182	162	166	143	147	109	125	171	177	135		147	149	174	176	106	

LS89	167		178		162	166	147	149	109	121	171		133	139	143		174		90	106
LS92	175		182		166		143	147	109	121	171		133	147	149		174	176	106	
LS94	175		182		162		143		109	121	177		133	135	143	149	174	176	90	100
LS95	175		178		166				109								174	176	90	106
S06	175		178		166		147		105	125	171		133	135	143	149	174		100	106
S12							143				171	177	133		147	149	174	176	100	106
S13					166		143		125		171		133	135	143	147	176		106	
S24	175		178		166		147		105	109	171		133		143	147	174	176	100	106
S32	175		178	182	162	170	143	147	109	125		177	133	135	143	149		176	106	
S35			178	182	166		147		121		171		133		143	149	176			
S36	167	175	178	182	162	166			105	121	171	177	133	135	143	149	174	176	100	106
S38					166		143	149	105										90	100
S43	175		178			166	147						133	147	143	149	174	176		106
S45	175			182				147	121	125	171	177	133	139	143	149	176			
S57	175		178	188	162	166	143				171	177	139	147	143		174		90	100
S58	175		178	182	162	166	143	147	121	125			135		147	149	176		106	
S63							143	147			171	177	133	135	143	147	174		106	
S66	167	175	178	182	166		143	149	105	121	171		133	135	143	149	174	176	100	106
Ana	167	175	178		162	166	147		121	125	171	177	135	139	147		174		100	106
Ivan	167	175	178		166		147		109	121	171	173	135	139	147		174		100	106
L01	175		178		162	166	147		125		171	177	133	149	145	147	174	176	100	106
L03	175		178		162	166	147	149	109	125	171	177	149		143	147	176		106	
LCRO1	175		182		166		143		125		171		135	149	145	147	176		90	100
LCRO1 1	175		178	182	166		147		109	125	171		135	149	143	147	174		100	106
LCRO2	167	175	178		162	166	147	149	105	121	171	177	135	149	143	149	176		106	
LCRO3	167	175	182		166		143	149	125		171		133	135	143	149	174	176	106	
LCRO4	175		178	182	162	166	143	149	109	125	171	177	149		147	149	174	176	100	106
LCRO5	175	179	178		166		143		105	121	171		133	139	147	149	174		90	106
LCRO6	167	175	178	182	166	170	147		109	125	171	177	133		143	149	174	176	100	106

LCRO9	175		178		166		143	149	125		171		135		149		176		100	106
L05	175		178	182	166	170	143	147	109	125	171	177	133		145	147	174		100	106
L06					170		147		109		177		133		143	149			100	106
L07	167	175	178	182	166		143	147	121	125	171		133	149	143	147	174	176	100	106
BIH01	167	175	178		162	166	143	147	109	125	171	177	133	139	143	149	176		100	106
BIH2	175		182		166		145	147	105		171		135		147				100	
SLV1	175		182		162	166	143	145	105		171	177	139		143		176		98	100
SLV2	167		182	184	166	170	149		109		171	177	135	142	143		174		100	106
SLV3	167		178		162	170	147	149	113		177		135	149	143	149	176		106	
SLV4	167	175	178	182	162	170	143	149	113	125	177		139		143	149	176		100	
SLV5	167	175	178	182	162		143	149	109	125	177		133	139	143	152	172	176	98	100
SLV6	167		178		162	170	143	149	113		177		135	149	143	149	176		106	
X001	167	175	178		162	170	143	149	109	113	177		139	149	147	152	176		102	106
X002	167	175	178	184	162		145	149	113	125	177		133	139	147	149	176		100	106
X003	167		182	184	162	166	143		109	113	171	179	135	139	143		176		90	102
X006	167		178	182	170		143	149	105	125	177		133	139	145	149	176		90	106
X007	167	175	178		162	166	143	149	105	125	171	177	133	139	143	149	176		106	
X009	167		178	182	162		147		117	125	177		139	141	143		172	176	102	106
X010	167	175	178		162	166	143		109	125	171	177	135	149	143	147	174	176	102	106
X011	167	175	184	188	162	170	143	149	105	125	177	178	139	149	143	147	176		98	100
X012	167		178	182	162	166	143	149	113	125	171	177	133	135	149	152	176		98	106
X013	167	171	182		162	170	149		109	113	177		133	135	143		176		98	106
LZOO1	175		180	182	166	170	143	149	117	125	173	177	133	142	143	149	174	176	104	106

	Fca391		Fca424		Fca650		Fca567		Fca82		Fca723		SRV	F115		Fca123		Fca559		Fca001	
LS05	224	236	172		133		90		243		197		82	234		138	142	118	122	179	189
LS10	236		172	176	133		88	90	243		197		82	234		142		110	118	179	189
LS166	236		172		133		88	90	233	245	197		82	230	234	138	142	114	122	179	
LS169	224	236	176		133		88		243		197		82	230		144		118		179	
LS23	224	236	176		133		88				197		82	230		138	144	118	122	179	
LS07			172	176	133		88	90			197		0	230	234	142	144	122		179	
LS09					133		90				197		82	230		138		114	122		
LS11					133		90				197		0	222	230	138		122			
LS156	236						88						82								179
LS22			172	176	133		88	90			197			230		138	144	118	122	179	
LS26					127	133	88		233		197		82			142	144				
LS29	236				133		88	90			197		0			144		122		179	
LS33	236		172		127	133	90		243		197		0			142	144	122		179	189
LS47	224		176		127	133	88	90	243		197		82	230		144		122			
LS48	224	236	172	176	133		90		243	245	197		0	230	234	138		118	122	179	
LS61			176		133		88	90			197		82	230		142		118	122	187	189
LS67	236		172	176	127	133	90		243	245	197		82	230	234	142		122		179	189
LS68	236		172	176	127	133	88		233	243	197			222	230	138	142	114	122	179	189
LS69	236		172	176	127	133	90		243		193	197	82	230	234	142		122		179	
LS70	224	236	176		133		88	90	243	245	197		82	230		138	144	110	122	179	
LS72	224	236	172		133		90		243	245	197		82	230	238	142		118		179	189
LS73	224		172		133		88	90	243		197		82	230		142		122		179	
LS81	236		176		127	133	90		245		197		82	230	234	138	142	118	122	179	
LS82	224	236	172	176	133		88	90	233	243	197		82	222	230	142		122		179	
LS85					133		88	90			197			230		138	142		122	179	189
LS86	224	236	176		133		88	90	243	245	197		0	230	234	138	142	110	118	187	189
LS88	236		172		133		88		233		197			230		138	144	122		179	

LS89			172	176	127	133	88	90			197		0	230		138	142	118	122	179	
LS92	224	236	176		133		90		243		197			230	234	142		122		179	
LS94	236		172	176	127		88		233	243	197		82			138	142	118	122	179	
LS95					133		90				197		82	230		138	142	118	122	179	189
S06					133		88	90			197		82			138	142	122		179	189
S12					133		90				197					138					
S13					133		90				197		82	230	234	142	144	118	122	179	
S24	224		176		133		88		243		197			230	234	138	144	118		177	179
S32			172		133		88	90			197					138	142	118		177	
S35	236				133		88	90	243		197	201	82	230	234	144		122		179	
S36	224	236	172		127	133	90		243	245	197		82	230	234	138		114	118	179	
S38							88	90					0			138	142	114	122		
S43					127		88	90					0	230				122		179	
S45	224	236			133		90		243		197		82	230		142	144	114	122	179	
S57	224	236	172	176	133		88	90	233		197		0	230	234	138		110	122	179	
S58					127	133	90				197		0	230	234	138	142	122		179	
S63					133		88	90	233	243			82	222	230		142	122		179	
S66					127	133	90									138					
Ana			172		127	133	90				197		0	230		142		118		179	
Ivan	236		176		127	133	88	90	233	243	197		82	230	234	142		122		179	
L01	224		172		127	133	88	90	233	245	197		82	230	234	142		118	126	179	
L03	236		172		127	133	88	90	243		197		82	230	234	142		122		179	
LCRO1	236		172		133		90		243		197		0	230		138	144	118	122	177	179
LCRO11	236		172		127	133	88	90	233	243	197		0	222	230	142		118	122	179	
LCRO2	236		172		133		90		243	245	197		0	230		142	144	118		179	189
LCRO3	224	236	172		133		88	90	243		197		82	230	234	138	142	118	122	179	
LCRO4	236		172		127	133	88	90	243		197		0	230	234	138	142	122		179	189
LCRO5	224		172		127	133	88		243		197		82	230		138	144	118	122	179	
LCRO6	224	236	176		127		88	90	233	243	197		82	222	234	142		118	122	179	
LCRO9	236		172		133		88	90	233	243	197		82	230	234	142		122		179	

L05	224	236	172		133		88		233	243	197		0	222	230	138	142	118	122	179	
L06	224		172		127	133	88	90	233	243	197		0	222		142		118	122		
L07	236		172		133		88		243		197		82	230	234	138		118		179	
BIH01	236		172		133		88	90	243		197	201	0	230	234	138	142	122		179	
BIH2	236		172		133		90		243	245	197		0	234		138	142	118	122	179	
SLV1	224	236	176		127	133	88	90	233	243	197	201	0	230		142	144	114	122	179	189
SLV2	236		176		127		88	90	243		197		82	230	234	142	144	110	114	181	189
SLV3			172	176	127	133	90				187	197	0	230	240	142		118	122	179	181
SLV4	236		172		129	133	90		243		179	191	82	230		142		118	122	189	
SLV5	224	236	172		129	131	90		243	245	179	197	82	222	230	142		122		179	189
SLV6	236		172		127	133	90		243		187	197	82	230	240	142		118	122	179	181
X001	236		168		131	133	88	90	243	249	187	197	0	230		142		122		179	
X002	236		176		133		88		243		187	193	82	230	234	144		114	122	179	
X003	236		168		133		90		243		187	197	82	230	234	142		118	122	181	189
X006	228	236	172		127		90		243		179	191	0	230		142		114		179	181
X007	224		172		127	133	88		243	245	187	197	0	234	240	138	142	118		181	189
X009	236		172		133		90		243	245	197	201	82	234	240	142		118	122	181	189
X010	236		168				90		233	243	197		0	230		144		118	122	179	
X011	228		172		131		88	90	243	245	197		82	222	244	144		122		179	189
X012	224	236	172		129	133	90		243		179	187	82	222	234	142		114	122	189	
X013	236		172		131	133	90		243	245	187	197	0	230	234	142		118	122	189	
LZOO1	224	228	176		129	133	90	92	233	243	197		82	222	244	138	142	114	118	185	189

Svi istraženi mikrosatelitni lokusi euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke su polimorfni. Na 20 istraženih mikrosatelita utvrdila sam prisutnost ukupno 95 alela. Kod 60 uzorka euroazijskog risa iz Hrvatske na 20 lokusa utvrdila sam prisutnost ukupno 62 alela, a srednji broj alela po lokusu je iznosio 3,1. Najviše alela imao je lokus Fca201 (5 alela), dok su 6 lokusa (Fca293, Fca391, Fca424, Fca650, Fca567) imali 2 alela. Kod 16 uzorka euroazijskog risa iz Slovačke na 20 lokusa utvrdila sam prisutnost ukupno 84 alela, a srednji broj alela po lokusu iznosio je 4,2. Najviše alela su imali lokus Fca201 i Fca723 (6 alela), a najmanje lokus Fca567 (2 alela).

Isprekidanu, disjunktну (ne-kontinuiranu) distribuciju alela sam uočila na 60% lokusa, dok je na lokusima Fca369, HDZ700, Fca742, Fca293, Fca424, Fca650, Fca567, Fca559 distribucija alela bila kontinuirana.

Među hrvatskim uzorcima prisutno je bilo 7 alela koji se nisu javili među uzorcima iz Slovačke, dok je među slovačkim uzorcima pronađeno 29 alela koji nisu bili prisutni u Hrvatskoj. U Tablici 14. dan je pregled broja i učestalosti alela euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke, a zatamnjени su privatni aleli obje populacije.

Parametri genske raznolikosti euroazijskog risa iz Hrvatske te Slovačke prikazani su u Tablici 15. Srednja vrijednost uočene heterozigotnosti (genske raznolikosti) risa iz Hrvatske iznosila je 0,435 s rasponom od 0,018 do 0,737. Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti bila 0,490 s rasponom od 0,018 do 0,743. Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže među hrvatskim uzorcima pronađeno je na tri lokusa (15%) – Fca742, Fca424, Fca567. Srednja vrijednost uočene heterozigotnosti risa iz Slovačke iznosila je 0,565 s rasponom od 0,188 do 0,875. Srednja vrijednost očekivane heterozigotnosti bila 0,599 s rasponom od 0,284 do 0,774. Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u među uzorcima iz Slovačke pronađeno je na dva lokusa (10%) Fca424 i Fca123.

Osim za uočenu i očekivanu heterozigotnost, uzorci iz Slovačke očituju više vrijednosti za sve ostale istražene mjere genske raznolikosti - alelno bogatstvo za Hrvatsku iznosi 3,049 a za Slovačku 4,159 te efektivan broj alela za Hrvatsku iznosi 2,113 a za Slovačku 2,590.

Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu za uzorke iz Hrvatske iznosi 0,093 dok za uzorke iz Slovačke iznosi 0,050.

Tablica 14. Prikaz veličine alela, broja i frekvencije alela za istražene mikrosatelitske lokuse euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke, zatamnjeni su aleli koji se javljaju u samo jednoj populaciji

Lokus	Veličina alela	Broj alela Hrvatska	Frekvencija alela Hrvatska	Broj alela Slovačka	Frekvencija alela Slovačka
F53	167	4	0,173	4	0,656
	168		0,000		0,031
	171		0,010		0,031
	175		0,798		0,281
	179		0,019		0,000
Fca161	178	3	0,588	4	0,500
	182		0,373		0,344
	184		0,000		0,125
	188		0,039		0,031
Fca369	162	3	0,268	3	0,531
	166		0,705		0,188
	170		0,027		0,281
HDZ700	143	3	0,475	4	0,406
	145		0,000		0,063
	147		0,458		0,094
	149		0,068		0,438
Fca742	105	4	0,236	5	0,156
	109		0,318		0,219
	113		0,000		0,313
	117		0,000		0,031
	121		0,164		0,000
	125		0,282		0,281
Fca132	171	3	0,660	4	0,188
	173		0,009		0,000
	177		0,330		0,750
	178		0,000		0,031
	179		0,000		0,031
Fca201	133	5	0,474	6	0,188
	135		0,272		0,219
	139		0,096		0,375
	141		0,000		0,031
	142		0,000		0,031
	147		0,061		0,000
	149		0,096		0,156
Fca247	143	4	0,342	5	0,531
	145		0,026		0,031
	147		0,307		0,125
	149		0,325		0,219
	152		0,000		0,094
Fca293	172	2	0,000	3	0,063
	174		0,536		0,094
	176		0,464		0,844
Lc106	90	3	0,103	5	0,063

	98		0,000		0,156
	100		0,302		0,219
	102		0,000		0,125
	106		0,595		0,438
Fca391	224	2	0,329	6	0,167
	228		0,000		0,100
	236		0,671		0,633
	237		0,000		0,033
	238		0,000		0,033
	239		0,000		0,033
Fca424	168	2	0,000	3	0,188
	172		0,581		0,594
	176		0,419		0,219
Fca650	127	2	0,224	4	0,267
	129		0,000		0,100
	131		0,000		0,167
	133		0,776		0,467
Fca567	88	2	0,492	2	0,250
	90		0,508		0,750
Fca82	233	3	0,220	5	0,067
	243		0,646		0,667
	244		0,000		0,033
	245		0,134		0,200
	249		0,000		0,033
Fca723	179	2	0,000	6	0,125
	187		0,000		0,250
	191		0,000		0,063
	193		0,009		0,031
	197		0,991		0,469
	201		0,000		0,063
F115	222	4	0,090	5	0,094
	230		0,660		0,531
	234		0,240		0,219
	238		0,010		0,000
	240		0,000		0,125
	244		0,000		0,031
Fca123	138	3	0,345	3	0,031
	142		0,483		0,719
	144		0,172		0,250
Fca559	110	4	0,036	4	0,031
	114		0,054		0,188
	118		0,313		0,281
	122		0,598		0,500
Fca001	177	4	0,038	3	0,000
	179		0,827		0,375
	181		0,000		0,219
	187		0,019		0,000
	189		0,115		0,406

Tablica 15. Parametri genske raznolikosti euroazijskog risa iz Hrvatske te Slovačke

HRVATSKA									
Lokus	N	Na	Ne	Ar	F	Fis	Ho	He	PHWE
F53	52	4	1,498	3,745	0,017	0.027	0,327	0,336	0,813
Fca161	51	3	2,056	2,999	0,084	0.094	0,471	0,519	0,632
Fca369	55	3	1,770	2,985	-0,003	0.006	0,436	0,439	0,160
HDZ700	58	3	2,282	3,000	0,233	0.241	0,431	0,567	0,080
Fca742	55	4	3,798	4,000	0,260	0.268	0,545	0,743	0,034*
Fca132	53	3	1,834	2,774	-0,079	-0.069	0,491	0,459	0,841
Fca201	57	5	3,118	5,000	0,174	0.182	0,561	0,685	0,178
Fca247	57	4	3,151	3,979	-0,079	-0.071	0,737	0,689	0,103
Fca293	55	2	1,989	2,000	0,159	0.168	0,418	0,502	0,279
Lc106	58	3	2,195	3,000	-0,203	-0.195	0,655	0,549	0,220
Fca391	41	2	1,791	2,000	0,172	0.184	0,366	0,447	0,293
Fca424	43	2	1,948	2,000	0,331	0.342	0,326	0,492	0,031*
Fca650	58	2	1,533	2,000	0,108	0.116	0,310	0,351	0,449
Fca567	60	2	1,999	2,000	0,300	0.307	0,350	0,504	0,021*
Fca82	41	3	2,066	3,000	0,102	0.114	0,463	0,522	0,621
Fca723	55	2	1,018	1,745	-0,009	0.000	0,018	0,018	1,000
F115	50	4	1,994	3,820	-0,083	-0.073	0,540	0,504	0,557
Fca123	58	3	2,620	3,000	0,219	0.227	0,483	0,624	0,074
Fca559	56	4	2,176	3,995	0,108	0.117	0,482	0,545	0,268
Fca001	52	4	1,431	3,955	0,042	0.051	0,288	0,304	0,086
Srednja vrijednost			2,113	3,049	0,093	0.113	0,435	0,490	

SLOVAČKA									
Lokus	N	Na	Ne	Ar	F	Fis	Ho	He	PHWE
F53	16	4	1,954	3,875	-0,152	-0.120	0,563	0,504	1,000
Fca161	16	4	2,599	3,938	0,086	0.118	0,563	0,635	0,389
Fca369	16	3	2,522	3,000	-0,243	-0.212	0,750	0,623	0,68
HDZ700	16	4	2,709	3,998	-0,090	-0.058	0,688	0,651	0,226
Fca742	16	5	4,000	4,938	0,000	0.032	0,750	0,774	0,266
Fca132	16	4	1,668	3,875	-0,093	-0.061	0,438	0,413	0,427
Fca201	16	6	4,000	5,875	-0,167	-0.135	0,875	0,774	0,502
Fca247	16	5	2,813	4,938	-0,067	-0.034	0,688	0,665	0,755
Fca293	16	3	1,380	2,998	0,319	0.348	0,188	0,284	0,134
Lc106	16	5	3,531	4,998	-0,046	-0.014	0,750	0,740	0,547
Fca391	15	6	2,261	6,000	0,163	0.197	0,467	0,577	0,544
Fca424	16	3	2,296	3,000	0,889	0.896	0,063	0,583	0,0001***
Fca650	15	4	3,061	4,000	0,109	0.143	0,600	0,697	0,387
Fca567	16	2	1,600	2,000	0,333	0.362	0,250	0,387	0,198
Fca82	15	5	2,036	5,000	-0,310	-0.279	0,667	0,526	0,868
Fca723	16	6	3,261	5,933	-0,172	-0.140	0,813	0,716	0,155
F115	16	5	2,813	4,938	-0,067	-0.034	0,688	0,665	0,481
Fca123	16	3	1,724	2,938	0,553	0.575	0,188	0,433	0,016*
Fca559	16	4	2,738	3,938	-0,083	-0.051	0,688	0,655	0,144
Fca001	16	3	2,829	3,000	0,033	0.065	0,625	0,667	0,582
Srednja vrijednost			2,590	4,159	0,050	0.058	0,565	0,599	

N - broj uspješno genotipiziranih jedinki po lokusu

Na – raznolikost alela (broj alela po lokusu) (*allelic diversity*)

Ne - broj efektivnih alela (*No. effective alleles*)

Ar – alelna bogatstvo (broj alela po lokusu neovisno o veličini uzorka) (*allelic richness*)

F - koeficijent križanja u bliskom srodstvu F_{is} (deficit heterozigota unutar populacije) (*fixation index*)

Ho - uočena heterozigotnost (genska raznolikost) (*observed heterozygosity*)

He - očekivana heterozigotnost (*expected heterozygosity*)

PHWE - vjerojatnost odstupanja između uočene i očekivane Hardy-Weinbergove ravnoteže

*- $P < 0,05$; **- $P < 0,01$; ***- $P < 0,001$

Provela sam zasebne statističke analize parametara genske raznolikosti za uzorke iz Hrvatske koji potječu iz razdoblja do 2000. godine (49 uzoraka), te nakon 2000. godine (11 uzoraka) (Tablica 16.). Svi lokusi na uzorcima prikupljenim do 2000. godine su polimorfni, dok se nakon 2000. dva lokusa (Fca723 i Fca001) javljaju kao monomorfni. Ukupno 10 alela koji se javljaju na 7 lokusa u uzorcima do 2000. godine ne javljaju se nakon toga, dok se jedan alel (alel 173 na lokusu Fca132) javio samo u uzorcima nakon 2000. i to samo na jednom uzorku. Srednja vrijednost prosječnog broja alela do 2000. iznosila je 3,05 (raspon od 2 do 5 alela po lokusu), dok nakon 2000. godine srednja vrijednost prosječnog broja alela po lokusa pada na 2,6 (s rasponom od 1 do 4). Uočena heterozigotnost za uzorke do 2000. godine za 20 lokusa iznosila je 0,438 a očekivana heterozigotnost 0,489. Uzorci prikupljeni nakon 2000. godine očitivali su uočenu heterozigotnost od 0,470 a očekivanu od 0,509 na ukupno 18 lokusa (budući su dva lokusa bila monomorfna). Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u među uzorcima do 2000. godine pronađeno je na dva lokusa (Fca742 i Fca567), a nakon 2000. osim dva monomorfna lokusa ukupno 3 lokusa značajno odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže (Lc106, Fca424, Fca123). Efektivan broj alela do 2000. godine je iznosio 2,104 a nakon 2000. godine 1,939. Alelna bogatstvo za hrvatske uzorke prikupljene do 2000. godine je iznosilo 2,964 dok je za uzorke nakon 2000. iznosilo 2,572.

Tablica 16. Parametari genske raznolikosti za uzorke iz Hrvatske koji potječu iz razdoblja do 2000. godine (49 uzoraka), te nakon 2000. godine (11 uzoraka)

	do 2000. godine (N=49)	nakon 2000. godine (N=11)
Prosječan broj alela	3,5	2,6
Ho (Uočena heterozigotnost)	0,438	0,470
He (Očekivana heterozigotnost)	0,489	0,509
Ar (Alelna bogatstvo)	2,964	2,572
Ne (Efektivan broj alela)	2,104	1,939

4.3.3 Vjerojatnost identifikacije jedinke upotrebom mikrosatelitskih lokusa

Pomoću računalnog programa GIMLET (VALIČRE, 2002.) izračunala sam statističku vjerojatnost identifikacije (IP) pojedine jedinke euroazijskog risa temeljem svakog od 20 istraženih lokusa pojedinačno (pri tome sam koristila genotipove uzoraka iz Hrvatske), što je prikazano u Tablici 17. Vrijednost u prvom stupcu izražava postotak vjerojatnosti identifikacije jedinke ako se koristi samo taj pojedinačni lokus i vrijednosti su poredane od najveće prema najmanjoj. U drugom stupcu nalaze se vrijednosti identifikacije jedinke ako se koristi više lokusa, i to ako se koristi lokuse od prvog navedenog u tablici pa sve do lokusa čija se vrijednost očitava. Povećavanjem korištenja broja lokusa povećava se i postotak vjerojatnosti identifikacije. Tako na primjer ako za identifikaciju jedinke koristimo samo prvih pet lokusa, vjerojatnost identifikacije je navedena kod petog lokusa Lc106 i iznosi 99,99%.

Tablica 17. Postotak vjerojatnosti identifikacije euroazijskog risa iz Hrvatske, lokusi su poredani po vjerojatnosti identifikacije jedinke

Lokus	Vjerojatnost identifikacije jedinke u %	
	za svaki lokus pojedinačno	koristeći više lokusa od prvog prema onom koji se očitava
Fca742	88,17	88,17
Fca201	86,12	98,23
Fca247	84	99,70
Fca123	78,65	99,93
Lc106	72,89	99,99
Fca559	72,55	100,00
Fca82	72,18	100,00
HDZ700	71,68	100,00
F115	70,33	100,00
Fca161	67,34	100,00
Fca567	62,88	100,00
Fca293	62,78	100,00
Fca424	62,29	100,00
Fca132	61,55	100,00
Fca369	61,77	100,00
Fca391	59,83	100,00
Fca650	52,54	100,00
F53	52,97	100,00
Fca001	50,6	100,00
Fca723	3,71	100,00

4.3.4 Procjena "uskog grla" (engl. bottleneck)

Procjenu prolaska populacije risa iz Hrvatske te dva uzorka iz Bosne i Hercegovine kroz „usko grlo“ efektivne veličine svoje populacije (tj. procjenu vjerojatnosti da su lokusi u ravnoteži između mutacije i genetičkog otklona) sam napravila pomoću programa Bottleneck. Izračun sam napravila pod pretpostavkom četiri mutacijska modela mikrosatelita: IAM (model bezgraničnih alela), TPM-70 (dvofazni model s 70% mutacija korak po korak i 30% višestrukih mutacija), TPM-95 (dvofazni model s 95% mutacija korak po korak i 5% višestrukih mutacija), te SMM (model korak po korak). Kako bi utvrdila da li u istraživanoj populaciji postoji značajan višak heterozigota po svim lokusima izabrala sam Wilcoxonov test zbroja rangova.

Tablica 18. Prikaz rezultata procjene prolaska populacije risa iz Hrvatske te Bosne i Hercegovine kroz „usko grlo“ efektivne veličine svoje populacije

lokus	n	uočena		I.A.M.				T.P.M. 70				S.M.M.				T.P.M. 95			
		Na	He	Heq	S.D.	DH/sd	Prob	Heq	S.D.	DH/sd	Prob	Heq	S.D.	DH/sd	Prob	Heq	S.D.	DH/sd	Prob
F53	108	4	0.338	0.413	0.179	-0.420	0.3380	0.506	0.145	-1.159	0.1440	0.588	0.100	-2.494	0.0300	0.560	0.118	-1.885	0.0600
Fca161	106	3	0.519	0.321	0.177	1.116	0.1480	0.381	0.170	0.812	0.2420	0.448	0.139	0.512	0.3600	0.429	0.149	0.600	0.3090
Fca369	114	3	0.437	0.324	0.185	0.612	0.3570	0.381	0.166	0.336	0.4410	0.456	0.140	-0.135	0.3640	0.442	0.143	-0.034	0.4110
HDZ700	120	4	0.572	0.409	0.177	0.923	0.2110	0.494	0.147	0.535	0.3410	0.577	0.116	-0.036	0.4040	0.555	0.122	0.146	0.4760
Fca742	114	4	0.743	0.418	0.180	1.810	0.0020*	0.498	0.149	1.639	0.0060*	0.577	0.112	1.483	0.0070*	0.568	0.120	1.462	0.0020*
Fca132	110	3	0.457	0.308	0.185	0.803	0.2840	0.383	0.172	0.427	0.4390	0.454	0.138	0.016	0.4120	0.440	0.147	0.109	0.4490
Fca201	118	5	0.688	0.499	0.165	1.145	0.1090	0.582	0.127	0.837	0.2110	0.664	0.090	0.260	0.5020	0.641	0.099	0.477	0.3780
Fca247	118	4	0.688	0.417	0.179	1.513	0.0210*	0.497	0.154	1.243	0.0440*	0.578	0.110	1.004	0.1230	0.569	0.119	1.001	0.1250
Fca293	112	2	0.503	0.178	0.166	1.962	0.0220*	0.200	0.170	1.782	0.0240*	0.233	0.173	1.564	0.0430*	0.228	0.172	1.594	0.0330*
Lc106	120	3	0.554	0.323	0.180	1.286	0.0910	0.372	0.175	1.039	0.1440	0.455	0.137	0.727	0.2370	0.440	0.147	0.775	0.2350
Fca391	86	2	0.436	0.184	0.164	1.536	0.1420	0.214	0.170	1.307	0.1770	0.239	0.166	1.191	0.1960	0.224	0.168	1.258	0.1820
Fca424	90	2	0.485	0.192	0.165	1.773	0.0850	0.208	0.165	1.685	0.0770	0.244	0.167	1.447	0.1020	0.225	0.168	1.557	0.0970
Fca650	120	2	0.342	0.181	0.165	0.977	0.2340	0.203	0.174	0.800	0.2870	0.219	0.171	0.720	0.3050	0.225	0.170	0.691	0.3190
Fca567	124	2	0.504	0.174	0.163	2.026	0.0180*	0.204	0.169	1.770	0.0190*	0.223	0.168	1.664	0.0260*	0.222	0.170	1.657	0.0280*
Fca82	86	3	0.531	0.336	0.187	1.039	0.1740	0.386	0.172	0.844	0.2190	0.462	0.136	0.506	0.3530	0.442	0.147	0.600	0.3100
Fca723	114	3	0.035	0.325	0.184	-1.573	0.0390*	0.369	0.171	-1.952	0.0220*	0.459	0.133	-3.178	0.0000*	0.434	0.150	-2.654	0.0020*
F115	104	4	0.515	0.430	0.177	0.480	0.4010	0.505	0.141	0.073	0.4380	0.589	0.101	-0.732	0.1920	0.564	0.120	-0.406	0.2860
Fca123	120	3	0.621	0.317	0.185	1.648	0.0420*	0.368	0.174	1.453	0.0490*	0.454	0.138	1.214	0.0810	0.432	0.150	1.266	0.0660
Fca559	116	4	0.540	0.419	0.177	0.686	0.2960	0.500	0.150	0.271	0.4770	0.587	0.106	-0.440	0.2730	0.569	0.120	-0.241	0.3160
Fca001	108	4	0.294	0.415	0.179	-0.676	0.2810	0.511	0.150	-1.442	0.1040	0.582	0.109	-2.647	0.0200*	0.564	0.113	-2.379	0.0280*

* - $p < 0,05$

n – ukupan broj alela; Na - broj alela; He - uočena genetička raznolikost; Heq – genetička raznolikost očekivana pod pretpostavkom ravnoteže između mutacija i genetičkog otklona; IAM - model bezgraničnih alela; TPM 70 - dvofazni model s 70% mutacija korak po korak i 30% višestrukih mutacija; TPM 95 - dvofazni model s 95% mutacija korak po korak i 5% višestrukih mutacija; SMM - model korak po korak

Značajna odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta koja ukazuju na postojanje manjka heterozigota po barem jednom od četiri korištena mutacijska modela postoje na ukupno 7 lokusa (Fca742, Fca247, Fca293, Fca567, Fca723, Fca123, Fca001).

U dvosmjernom Wilcoxon testu IAM te TPM 70 mutacijski modeli pokazuje statistički značajan višak heterozigota po svim lokusima i time ukazuju na pojavu "uskog grla" kod risova u Hrvatskoj.

Tablica 19. Rezultati Wilcoxon testa pod pretpostavkom četiri mutacijska modela

Vjerojatnosti	IAM	TPM 70	TPM 95	SMM
pd	0,99985	0,98926	0,92318	0,85287
pe	0,00035*	0,01198*	0,08248	0,15590
pde	0,00071*	0,02395*	0,16496	0,31179

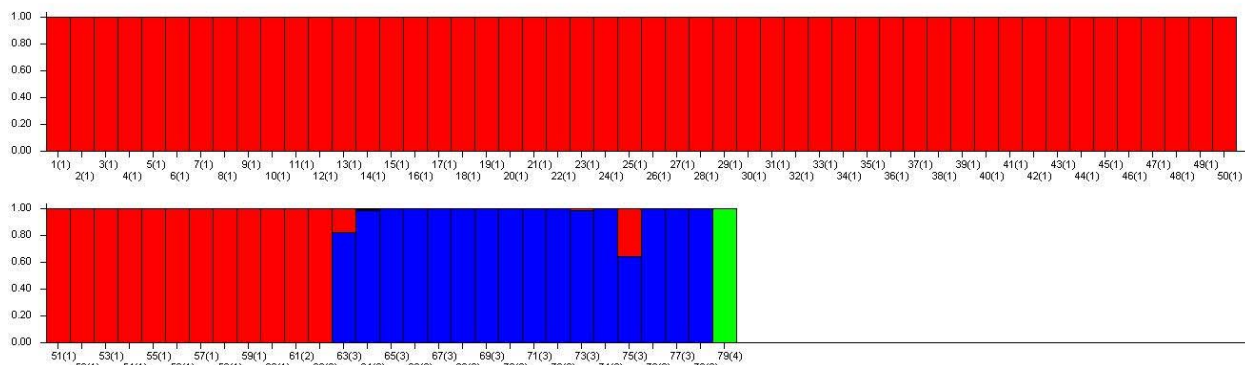
pd - vjerojatnost dobivena testiranjem manjka heterozigota jednosmjernim testom (ukazuje na širenje populacije)

pe - vjerojatnost dobivena testiranjem viška heterozigota jednosmjernim testom (ukazuje da je populacija prošla kroz "usko grlo")

pde - vjerojatnost dobivena testiranjem viška i manjka heterozigota dvosmjernim testom

4.3.5 Procjena postojanja subpopulacija

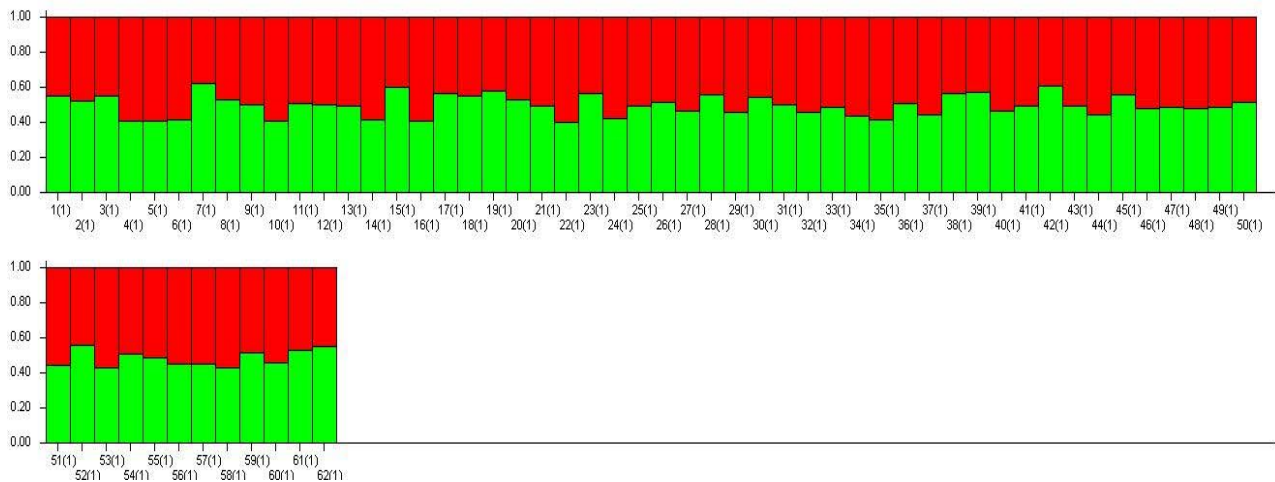
Procjenu postojanja subpopulacija, tj. strukturiranje u dvije ili više grupacija napravila sam uporabom računalnog programa Structure. Procjenu sam napravila odvojeno za sve analizirane uzorke (Hrvatska, Slovačka, Bosna i Hercegovina), i odvojeno za uzorke iz Hrvatske te Bosne i Hercegovine. Na Slikama 25. i 26. prikazala sam rezultate programa Structure za "no admixture" model strukturiranja podataka (populacije nisu u kontaktu tj. nema migracija), pod pretpostavkom postojanja 3 populacije i "burn" parametrom od 10000 za sve analizirane uzorke. Stupovi na slici 26. predstavljaju jedinice poredane po redosljedu kao u Tablici 13. navedenoj u Rezultatima



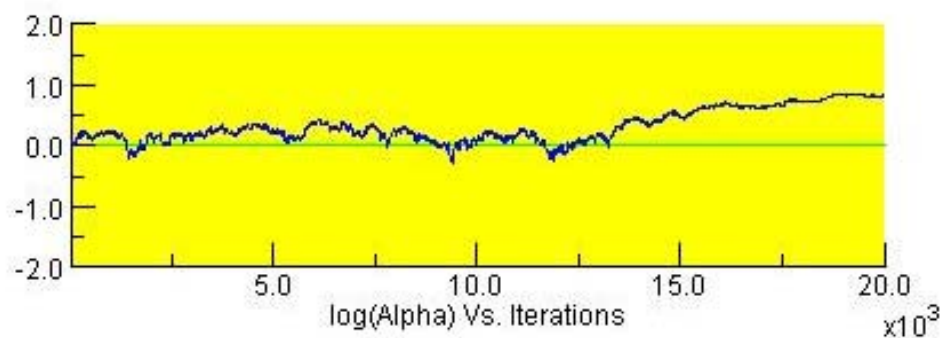
Slika 26. Prikaz rezultata programa Structure 2.2 pripadnosti jednoj od tri teoretske subpopulacije po "no admixture" modelu za 60 uzoraka iz Hrvatske, 16 uzoraka iz Slovačke, 2 uzorka iz Bosne i Hercegovine, te jedan uzorak iz Zoološkog vrta Zagreb, jedinke su poredane po redosljedu kao u Tablici 13. navedenoj u Rezultatima

Rezultati pokazuju jasno strukturiranje u tri odvojene populacije; populacija 1 – uzorci iz Hrvatske te Bosne i Hercegovine, populacija 2 – uzorci iz Slovačke, populacija 3 – uzorak risa iz ZOO vrta Zagreb. S time da dva slovačka uzorka SLV1 i x010 (oznake 63 i 75) djelomično pokazuju pripadnost i Hrvatskoj populaciji.

Slikama 27. i 28. prikazala sam rezultate programa Structure za "admixture" model strukturiranja podataka (populacije su u kontaktu), pod pretpostavkom postojanja 2 populacije i "burn" parametrom od 10000 za 60 uzoraka iz Hrvatske te dva uzorka iz Bosne i Hercegovine. Stupovi na slici 27. predstavljaju jedinke poredane po redosljedu kao u Tablici 13. navedenoj u Rezultatima (završno s uzorkom BiH2).



Slika 27. Prikaz rezultata programa Structure 2.2 pripadnosti jednoj od dvije teoretske subpopulacije po "admixture" modelu za 60 uzoraka iz Hrvatske i 2 uzorka iz Bosne i Hercegovine, jedinke su poredane po redosljedju kao u Tablici 13. navedenoj u Rezultatima



Slika 28. Prikaz rezultata programa Structure 2.2 pripadnosti jednoj od dvije teoretske subpopulacije po "admixture" modelu za 60 uzoraka iz Hrvatske i 2 uzorka iz Bosne i Hercegovine, jedinke poredane prema vrijednosti varijable Q (dolje)

Na slikama 27. i 28. je jasno vidljivo da ne postoji podjela uzoraka jednoj od dvije hipotetske grupe (crvene ili zelene) jer postoji kontinuitet u vrijednosti varijable Q. Nije uočena pripadnost ili samo crvenoj ili samo zelenoj grupi. Na Slici 28. prikazano je mijenjanje vrijednosti log(alpha)

tijekom simulacije. Kod postojanja grupacija varijabla alpha je uglavnom konstantna i ne prijelazi vrijednost 0,2 (PRITCHARDA i sur., 2007.).

4.5.6 Određivanje spola

Spol istraživanih jedinki odredila sam analizom SRY gena. Spol je uspješno određen za ukupno 70 jedinki, dok kod 9 jedinki spol nije mogao biti utvrđen. Od 70 risova kojima je uspjelo odrediti spol, ukupno 27 (38.6%) jedinki bilo je ženskog spola, dok su 43 (61,4%) jedinke bile muškog spola (Tablica 13.).

5. Rasprava

5.1 Uspješnost sekvenciranja kontrolne regije i genotipizacije uzoraka

Uspješnost umnažanja željenog slijeda DNA lančanom reakcijom polimerazom (PCR) ovisi o početnom broju očuvanih DNA molekula u uzorku. Kvaliteta i kvantiteta DNA uzorka ovisi o načinu čuvanja i starosti uzorka, što je posebno važno kod neinvazivnih i povijesnih (muzejskih) uzoraka (WANDELER i sur., 2007.). Prilikom planiranja istraživanja važno je uzeti u obzir izvor i tip uzoraka. U ovom istraživanju najvažniji izvor uzoraka bili su povijesni uzorci, budući je teško doći do uzoraka risa iz prirode. Ne samo zbog malog broja životinja prisutnih u prirodi, već i zbog skrovitog načina života risa, pa je hvatanje živih životinja i prikupljanje invazivnih uzoraka je otežano. Pristup neinvazivnim uzorcima poput izmeta i dlaka je također otežan, budući ris zakapa izmet a zamke za hvatanje dlaka učinkovite su samo na lokacijama koje risovi koriste za markiranje područja (SCHMIDT i sur., 2006.). Prilikom izbora povijesnih uzoraka trofeja risa morala sam uzeti u obzir da pri tome ne smijem oštetiti trofej, tako da nisam bila u mogućnosti uzeti uzorak za koji su istraživanja pokazala najveći uspjeh. Kod uzoraka kosti iberijskog risa najbolji uspjeh umnažanja mitohondrijske te nuklerane DNA bio je iz uzoraka mastoidnog izdanka temporalne kosti (CASAS-MARCE i sur., 2010.), no uzimanje tog uzorka oštećuje trofej stoga sam u ovom istraživanju koristila hrskavice iz nosne šupljine trofejnih lubanja, što uopće ne oštećuje trofej koji je vrlo dragocjen kolekcionarima. Također, isto istraživanje upućuje da najveći uspjeh umnažanje mitohondrijske i nuklerane DNA iz štavljenih krzna ima uzorak kandže (CASAS-MARCE i sur., 2010.), no zbog manjeg oštećenja krzna ja sam uzimala uzorak mekušići. Usporedba uspješnosti umnažanja mikrosatelitskih lokusa iz uzoraka mišića pohranjenih u etanolu i kandži s štavljenih krzna kod žderonje (*Gulo gulo*) i euroazijskog risa pokazala je da je uspješnost genotipizacije iz kandži jednaka onoj iz mišića (HEDMARK i ELLEGREN, 2005.). Istraživanje na iberijskom risu je pokazalo da je umnažanje mitohondrijske i nuklerane DNA uspješnije iz mekušići nego kože štavljenih trofeja (CASAS-MARCE i sur., 2010.). Smatra se da je to posljedica prisutnosti PCR inhibitora u koži, dok prisutnost inhibitora nije pronađena u mekušićima. Problem kod trofejnih uzoraka je da obrada trofeja koja uključuje kuhanje te čak i izbjeljivanje kosti te obrada kože enzimskim reagensima oštećuju DNA i inhibira PCR reakciju (HALL i sur., 1996.; CASAS-MARCE i sur., 2010.).

Umnažanje mtDNA kod arheoloških uzoraka trebalo bi biti uspješnije nego umnažanje nuklearne DNA, čak i nakon dužeg perioda čuvanja, zbog činjenice da je mtDNA u stanici prisutna u većem broju kopija (WANDELER i sur., 2007.). No DNA se zbog oštećenja razlaže na kraće

fragmente (FRANTZEN i sur., 1998), stoga se preporuča analiza sekvenci dužine manje od 200 do 300 pb (TABERLET i sur., 1999.). Dokazana je korelacija između uspješnosti umnažanja mtDNA i mikrosatelita s dužinom željene sekvence (BROQUET i sur., 2007.). CASAS-MARCE i sur. (2010.) su potvrdili veću uspješnost amplifikacije markera mitohondrijske nego nuklearne DNA iz više tipova muzejskih uzoraka, no uočili su lošiju amplifikaciju mtDNA nego nuklearne iz uzoraka mekuših muzejskih uzoraka, što objašnjavaju nižom koncentracijom mtDNA u ovom tipu uzorka.

U ovom istraživanju umnažala sam kontrolnu regiju dužine 850 pb, pa sam zbog dužine fragmenta i očekivala slabiju uspješnost umnažanja kod neinvazivnih i povijesnih uzoraka. No zbog niske raznolikosti već istraženih kraćih fragmenata mtDNA risa na malom broju uzoraka iz Hrvatske i Slovenije (POLANC 2003., GOMERČIĆ i sur., 2006.) željela sam istražiti što dužu sekvencu da provjerim postojanje polimorfni mjesta na dužem slijedu. POLANC (2003.) je analizirao 16 uzoraka risa iz Slovenije, te je na slijedu dugom 450 pb utvrdio postojanje jednog haplotipa. GOMERČIĆ i sur. (2006) su analizirali dva uzorka u dužini 184 pb i također potvrdili prisutnost jednog haplotipa.

Kontrolnu regiju mitohondrijske DNA umnožila sam za ukupno 113 različita uzorka risa (za 11 od 124 istražena uzorka je utvrđeno da ne pripadaju risu), od čega sam kvalitetan slijed dobila kod 32 uzorka tj. 28.3%. Važno je naglasiti da sam sljedove kontrolne regije dobila samo kod invazivnih uzoraka (30 od 31 analiziranih uzoraka, uspješnost 97,8%) te kod dva uzorka dlake (2 od 4 analizirana uzorka dlake, uspješnost 50%). Niti jedan povijesni uzorak nije dao kvalitetan slijed kontrolne regije.

Uspješnost genotipizacije je bila 100% kod svih istraženih invazivnih uzoraka, dok je uspješnost kod uzoraka mekuših i lubanja bila približno jednaka (61,5% i 57,7%). Genotipizacija iz neinvazivnih uzoraka te dva uzorka preparirane kože nije bila uspješna.

5.2 Provjera da li neinvazivni uzorci pripadaju euroazijskom risu

Od 12 uzoraka izmeta kod kojih sam dobila kvalitetan slijed kontrolne regije pretragom GenBank baze podataka utvrdila sam da su dva uzorka pripadala euroazijskom risu, dva vuku (*Canis lupus*), sedam lisicama (*Vulpes vulpes*), dok je jedan uzorak pripadao europskoj krtici (*Talpa europea*). Budući da izmet risa, vuka i lisice oblikom i sastavom može biti sličan sakupljači su krivo identificirali izmet kao risji, ili se u slučaju lisica i krtice možda umnožila mtDNA risjeg plijena.

5.3 Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA

Utvrđila sam da svi analizirani uzorci iz dinarske (Hrvatska, Slovenije, Bosna i Hercegovine) te karpatske populacije (Slovačka) pripadaju istom haplotipu koji je identičan haplotipu euroazijskih risova iz Baltičkih zemalja (HELLBORG i sur., 2002.), Karpata te iz reintrodirane švicarske populacije (GUGOLZ i sur., 2008.). Takav rezultat je logičan budući da su populacije u Dinaridima i Alpama nastale reintrodukcijom malog broja životinja iz karpatske populacije. Do sada je istražen tek manji broj uzoraka risa iz karpatske populacije među kojima je pronađen samo jedan haplotip. Postavlja se pitanje da li bi se analizom većeg broja uzoraka utvrdila prisutnost novih haplotipa mtDNA u Karpatima? No, budući da je u Dinaride reintrodirano samo šest životinja, za koje se pretpostavlja da su bile u srodstvu, logično je za očekivati da se u Dinaride naselio samo jedan haplotip (i u slučaju da ih je u Karpatima prisutno više).

HELLBORG i sur. (2002.) analizirali su 700 parova baza kontrolne regije 276 uzoraka risa iz Skandinavije (Švedska, Norveška), Finske i Baltika (Estonija i Latvija) i pronašli četiri haplotipa. Jedan haplotip je pronađen u Skandinaviji, Finskoj i Baltičkim državama, u Finskoj i Baltiku su pronađena još dva, te četvrti koji je bio jedinstven samo za Baltik. HELLBORG i sur. (2002.) predlažu da je srednja razina raznolikosti mtDNA moguća karakteristika euroazijskih risova nastala kao posljedica preživljavanja populacije u samo jednom glacijalnom utočištu.

GUGOLZ i sur. (2002.) analizirali su 9 muzejskih uzoraka izumrle populacije euroazijskog risa s područja Alpa te 16 uzoraka recentnih populacija (autohtone populacije Balkana, Baltika, Skandinavije, Karpata, Kavkaza, Mongolije i Siberije, te reintrodirane švicarske populacije). Sekvencirali su dva odvojena fragmenta kontrolne regije, dužine 157 pb i 143 pb, među kojima se nalazi oko 280 pb duga ponavljajuća sekvenca. Potvrdili su postojanje sedam različitih haplotipa, od čega su četiri već poznata iz istraživanja HELLBORG i sur. (2002.). Od četiri novo otkrivena haplotipa H5 (EU107389) nađen je na uzorcima iz Balkana i Kavkaza, H6 (EU107390) nađen je u jednom uzorku izumrle Alpske populacije (u kojoj se javljaju još i H1, H2, H3) te u mongolskim i sibirskim uzorcima, dok je haplotip H7 (EU107391) nađen samo kod balkanske populacije. Autori dovode u pitanje pouzdanost podatka o pronalasku haplotipa H6 u u jednom uzorku izumrle Alpske populacije, budući da se radi o uzorku starom preko 200 godina.

GUGOLZ i sur. (2002.) na temelju ovih podataka predlažu scenarij zajedničke evolucije risjih populacija u Alpama i na sjeveru Europe. Predlažu postojanje glacijalnog utočišta na jugu

Europe, vjerojatno u Italiji (što potvrđuju i nalazišta iz kasnog Pleistocena) ili u zapadnoj Francuskoj, odakle se ris proširio preko Alpa, centralne Europe i Danske do Švedske. Alternativna ruta se mogla odvojiti u centralnoj Europi putem koje je uz jugoistočnu obalu Baltičkog mora kolonizirana Finska. Autori naglašavaju mogućnost odvojene evolucije balkanske populacije kod koje je među samo tri uzorka pronađeno čak dva različita haplotipa (od toga jedan jedinstven za balkansku populaciju). Temeljem haplotipa H4 čija prisutnost je potvrđena u baltičkim zemljama (HELLBORG i sur., 2002.), te na Karpatima i u reintroduciranoj alpskoj populaciji (GUGOLZ i sur., 2002.), autori predlažu izolaciju karpatske populacije tijekom posljednjeg ledenog doba. Nisku frekvencija ovog haplotipa u Baltiku objašnjavaju sekundarnim kontaktom među populacijama.

Uzorak risa iz Zagrebačkog zoološkog vrta imao je haplotip koji se ne poklapa s niti jednom od sekvenci koje su pohranjene u GenBank bazi. Prema podacima EAZA-e (European Association for Zoo and Aquaria) otac te životinje je bio podrijetlom iz Karpata, točno podrijetlo majke je nepoznato, no zna se da je djed s majčine strane sa sjevera Europe. Vjerojatno je zbog takvog križanja životinja iz populacija koje prirodno nisu u kontaktu nastao je haplotip koji nije prisutan u prirodi.

5.4 Ponavljajuću sekvencu unutar kontrolne regije

Do sada je opisano 5 tipova ponavljajućih sekvenci (engl. repetitive sequence - RS) unutar kontrolne regije mitohondrijske DNA (HOELZEL 1993.; HOELZEL i sur., 1994.). Potvrđene su kod više vrsta kralježnjaka, uključujući ribe (BUROKER i sur., 1990.; STARNER i sur., 2004.; TAKAGI i sur., 2006.), ptice (EBERHARD i sur., 2001.) i više vrsta sisavaca (HOELZEL i sur., 1994., GEMMELL i sur., 1996.; MATSON i BAKER 2001.; JAE HEUP i sur., 2001.; FERRANDO i sur., 2004; PURDUE i sur., 2006.).

Kontrolna regija domaćih mačaka (*Felis catus*) duga je oko 1560 pb, a karakteriziraju ju dvije odvojene ponavljajuće sekvence (RS-2 i RS-3) na suprotnim stranama konzerviranog središnjeg dijela kontrolne regije (LOPEZ i sur., 1996.). Sekvenca označena kao RS2 sastoji se od 80 do 82 pb, očuvanog je slijeda (91-98% sličnosti), te autori uočavaju veću stabilnost kod sljedova u kojim se RS2 sekvenca ponavlja dva ili tri puta. Ponavljanja dužine 40, 80 ili 160 pb su kod do 50% istraženih jedinki očitovale heteroplasmiju, a najvjerojatniji mehanizam njihovog nastanka je klizanje DNA prilikom replikacije (HOELZEL i sur., 1994.). No smatra se da RS-2 i RS-3 imaju i

funkcionalnu ulogu, te su stoga podvrgnuti utjecaju selekcijskog pritiska (JAE HEUP i sur., 2001.). Smatra se da ta ponavljanja možda pomažu vezivanju proteina uključenih u replikaciju mtDNA, pa je zbog toga njihova dužina pod selekcijom budući se duže sekvence sporije umnažaju što je nedostatak (JAE HEUP i sur., 2001.). Također se smatra da ponavljanja imaju ulogu u kompenziranju štetnih mutacija koje se nakupljaju tijekom života jedinke (JAE HEUP i sur., 2001.). Uočeno je da broj ponavljanja može varirati s dobi i generacijskim razdobljem, te da starije jedinke (SOLIGNAC i sur. 1987.) i sustavi s dužim generacijama (CASANE i sur. 1997.) prosječno imaju duža ponavljanja sekvenci.

Istraživanje na velikim mačkama (lav, tigar, leopard, snježni leopard, jaguar) utvrdilo je prisutnost obje ponavljajuće sekvence (RS-2 od 80pb i RS-3 od 6-10 pb) unutar kontrolne regije (JAE HEUP i sur., 2001.). RS-2 sekvenca se ponavljala jedan do četiri puta, dok su u 80% slučajeva bila prisutna tri ponavljanja. Kod afričkih geparda (*Acinonyx jubatus*) RS-2 sekvenca ponavlja se 4 puta, unutar čega je utvrđena prisutnost šest različitih haplotipova (FREEMAN i sur., 2001). Istraživanje provedeno na divljoj (*Felis silvestris*) i domaćoj mački (*Felis catus*) također potvrđuje prisutnost ponavljajuće sekvence dužine 80 pb, koja se ponavlja jedan do četiri puta, te autori sukladno broju ponavljanja razlikuju haplotipove mitohondrijske DNA (HERTWIG i sur., 2009.).

U ovom istraživanju unutar sekvence kontrolne regije euroazijskog risa identificirala sam ponavljajuću sekvencu dužine 80 pb, koja se ponavlja 3.5 puta (3 ponavljanja od 80 pb i ponavljanje 44 pb). No kod 8 (25%) od 32 analizirana uzorka sekvenca se ponavlja 2.5 puta, odnosno jedno ponavljanje od 80 pb nedostaje. U sklopu ovog istraživanja nije provedeno kloniranje uzoraka stoga nisam mogla utvriti prisutnost heteroplazmije, stoga sam ove promjene definirala kao dvije varijante haplotipa H4.

5.5 Genska raznolikost euroazijskog risa iz Hrvatske

Svih 20 istraženih mikrosatelitnih lokusa euroazijskog risa iz Hrvatske i Slovačke bili su polimorfni. U Hrvatskoj sam utvrdila niži srednji broj alela (3,1) u odnosu na izvornu populaciju iz Slovačke (4,2). Također, uočena heterozigotnosti risa iz Slovačke iznosila je 0,565 i veća je od uočene heterozigotnosti risa iz Hrvatske (0,435). Među slovačkim uzorcima pronađeno je 29 alela koji nisu prisutni u Hrvatskoj, dok je među hrvatskim uzorcima bilo prisutno 7 alela koji se nisu javili među uzorcima iz Slovačke. Privatni aleli pronađeni među Hrvatskim uzorcima najvjerojatnije

su posljedica malog broja obrađenih uzoraka iz Slovačke (N=16), a upravo taj mali broj uzoraka još više naglašava veliki udio alela koji se izgubio u Hrvatskoj u odnosu na izvornu populaciju (29).

Među uzorcima iz Hrvatske te Bosne i Hercegovine nije utvrđena podjela na subpopulacije, dok se jasno odvajaju populacija u Dinaridima (uzorci iz Hrvatske te BiH) i karpatska populacija (uzorci iz Slovačke), te kao zasebna cjelina uzorak iz zagrebačkog zoološkog vrta. Iako je populacij u Dinaridima nastala naseljavanjem životinja iz Karpata, zbog 37 godina izoliranosti te se dvije populacije danas jasno razdvajaju.

Pojava uskog grla u populaciji uzrokuje smanjenje broja alela i genske raznolikosti, s time da se smatra da se raznolikost alela gubi brže nego heterozigotnost. Deficit alela nastaje kao posljedica kompleksa četiri parametra – vrijeme koje je proteklo od uskog grla, odnos efektivne veličine populacije prije i neposredno nakon uskog grla, brzina mutacije i veličina analiziranog uzorka (CORNUET i LUIKART, 1996.). Kod analiza pojave uskog grla IAM model se preporučuje za upotrebu kod alozima, a SMM model kod mikrosatelita. No budući da ta dva modela predstavljaju ekstreme, najbolje je koristiti TMP model jer lokusi najvjerojatnije mutiraju po modelu koji je u sredini između ta dva modela (PIRY i sur., 1999.) U dvosmjernom Wilcoxon testu IAM te TMP 70 mutacijski modeli pokazuju statistički značajan višak heterozigota po svim lokusima i time ukazuju na pojavu "uskog grla" kod risova u Hrvatskoj. Uobičajno je da različiti modeli ne daju jednake rezultate za analizu pojave uskog grla, no s obzirom na korištene markere smatram da su IAM i TMP model pouzdano potvrdili postojanje uskog grla.

Koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F, the inbreeding coefficient) nam govori u koliko bliskom srodstvu su jedinke u populaciji tj. u slučaju jedne životinje u koliko bliskom srodstvu su roditelji jedinke, a izračun se temelji se na povećanju udjela homozigotnih jedinki. Npr. pri $F=0,0625$ roditelji jedinke su prvi rođaci. Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu za sveukupne uzorke iz Hrvatske iznosi 0,093.

HELLBORG i sur. (2002.) analizirali su 11 mikrosatelitskih lokusa 276 uzoraka risa iz Skandinavije (Švedska, Norveška), Finske i Baltika (Estonija i Latvija), te utvrdili heterozigotnost u rasponu 0,51 – 0,62 i potvrdili posljedice nedavnog uskog grla u skandinavskoj populaciji. Veća heterozigotnost populacija iz Finske (0,62) i Baltika (0,60) objašnjava se kontaktom s velikom populacijom risa u Rusiji.

SPONG i HELLBORG (2002.) analizirali su 12 mikrosatelitskih lokusa 89 uzoraka euroazijskog risa iz Švedske i 107 uzoraka iz Norveške, da bi potvrdili posljedice uskog grla. Procjenjuje se da je brojnost Skandinavske populacije krajem 1920-ih pala ispod 30 životinja, te da

do porasta na današnju brojnost od oko 2 000 životinja nije bila u kontaktu sa susjednom finskom populacijom. Prosječna heterozigotnost je iznosila 0,49 s prosječnim brojem alela 4,7. Autori su primijenili više kompjuterskih mutacijskih modela za dokazivanje uskog grla, te su pomoću IAM modela potvrdili postojanje uskog grla, dok SMM nije uočio usko grlo. Budući da istraživanja pokazuju da mutacija mikrosatelita odgovara IAM više nego SMM, autori smatraju da je usko grlo potvrđeno. Ostali testovi (k test, g test) koji su autori primijenili također nisu potvrdili postojanje uskog grla, što autori tumače mogućim postojanjem migracija u drugoj polovici 20. stoljeća iz Finske, te najvjerojatnije objašnjenje da je korišten premali broj lokusa što umanjuje moć razlučivanja upotrijebljenih programa.

RUENESS i sur. (2003.) istražili su Skandinavsku populaciju risa, a cilj im je bio opisati prostornu strukturu populacije koja je doživjela usko grlo i brzo se proširila nakon toga. U istraživanje su uključili i uzorke iz Karpata te Rusije, i prethodno istražene uzorke iz Finske i Baltika. Potvrđena je prosječna raznolikost skandinavskih uzoraka od 0,5, što je najniže među istraženim populacijama. Najveću gensku raznolikost imalo je tek 11 uzoraka iz Rusije (0,699). Uočeno je da su uzorci sa sjevera Skandinavije pokazali veću raznolikost nego oni s juga, dok je razlikovanje u smjeru zapad – istok slabije izraženo. Sukladno provedenim analizama autori predlažu postojanje najmanje tri sub-populacije unutar Skandinavije. Pitanje je da li je ta podjela nastala nakon uskog grla tj. nakon širenja populacije iz jedne jezgre ili je postojala i prije. Kompjuterski programi upućuju da je razlika nastala kao posljedica izolacije zbog udaljenosti, no kada se u obzir uzme sposobnost disperzije risa ovaj model se dovodi u pitanje. Autori predlažu da je na sjeveru Skandinavije opstala još jedna populacija o kojoj ne postoje zapisi, te da trenutna populacija risa u Skandinaviji potječe iz više nego jedne jezgre, a da je razlika među populacijama moguća posljedica teritorijalnog ponašanja risa. PAMILO (2004.) dovodi u pitanje zaključke RUENESS i sur. (2003.) zbog nepodudaranja postavljene hipoteze i korištenih kompjuterskih analiza. PAMILO (2004.) koristi stohastički model i potvrđuje da je današnja genska raznolikost skandinavske populacije mogla nastati kao posljedica kolonizacije sjevera i istoka iz jednog izvora. JORDE i sur. (2006.) objavljuju odgovor na članak PAMILO (2004.), te potvrđuju svoje stajalište da su koristili odgovarajući model („stepping-stone“) za predloženu hipotezu te brane svoje zaključke.

BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a.) analizirali su 17 mikrosatelitskih lokusa na 350 uzoraka euroazijskog risa autohtonih i reintroductiranih populacija. Uočena heterozigotnost autohtonih populacija iznosila je 0,54 – 0,68 dok su reintroductirane

populacije pokazivale manju heterozigotnost u usporedbi s populacijom iz koje potječu. Reintroducirana populacija iz Jure izgubila je 27% alela, a Alpska 39% alela u odnosu na karpatsku populaciju iz koje potječu. Heterozigotnost ovih populacija slična je niskoj heterozigotnosti nekih populacija divljih mačaka kod kojih je parenje u srodstvu dovelo do kongenitalnih i reproduktivnih poremećaja. Autori su dokazali da se sve istražene populacije genetski razlikuju, osim reintroducirane populacije u Bavarsko-Bohemskej šumi koja je ista kao izvorna karpatska populacija. Najveća razlika uočena je između skandinavske i reintroducirane alpske populacije. Filogenetsko stablo odvaja tri skupine - karpatsku populaciju i reintroducirane populacije potekle iz nje; skandinavsku skupinu te Finsku i Baltik odvajaju u zasebnu skupinu. Balkanska te sibirski populacija odvajaju se od svih ostalih grupa, no rezultat nije pouzdan budući je za svaku analiziran tek jedan uzorak.

SCHMIDT i sur. (2009.) istražili su gensku strukturu euroazijskog risa iz Poljske, Latvije i Estonije, te su pri tome analizirali šest mikrosatelitskih lokusa na 64 uzorka. Uočena heterozigotnost je iznosila 0,68 a srednji broj alela po lokusu 6,7. Parenje u srodstvu nije potvrđeno u niti jednoj populaciji. Najniža raznolikost uočena je u najzapadnijem, perifernom dijelu populacije – na sjeveroistoku Poljske, što se podudara i sa smanjenom morfološkom raznolikošću te populacije u usporedbi s onima iz Latvije i Estonije. Ta populacija ipak ima veću raznolikost nego ona u Skandinaviji iako se smatra da je dva puta gotovo dovedena pred izumiranje. No pretpostavlja se da su uska grla bila kratkotrajna te da raznolikost podižu imigranti iz susjednih populacija, što potvrđuje činjenica da parenje u srodstvu nije pronađeno.

Tablica 20. Pregled genske raznolikosti do sada istraženih populacija euroazijskog risa

Zemlja	Autor	Broj istraženihmi krosatelita	Srednji broj alela po lokusu	Genska raznolikost
Hrvatska	Ovo istraživanje	20	3,1	0,435
Slovačka	Ovo istraživanje	20	4,2	0,565
Švedska, Norveška	HELLBORG (2002.)	11	4,2	0,50
Finska, Baltik (Estonija i Latvija)	HELLBORG (2002.)	11	6,0	0,63
Švedska, Norveška	SPONG i HELLBORG (2002.)	12	4,7	0,49
Švedska, Norveška, Finska, Baltik, Karpati, Rusija	RUENESS i sur. (2003.)	10	7,3	0,606
Norveška	RUENESS i sur. (2003.)	10	4,4	0,517
Švedska	RUENESS i sur. (2003.)	10	4,1	0,506
Finska	RUENESS i sur. (2003.)	10	5,4	0,633
Baltik	RUENESS i sur. (2003.)	10	4,7	0,612
Rusija	RUENESS i sur. (2003.)	10	5,0	0,699
Češka	RUENESS i sur. (2003.)	10	2,8*	0,510
Autohtone populacije (Norveška, Švedska, Finska, Estonija, Latvija, Slovačka, Češka, Poljska, Rumunjska, Makedonija)	BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a.)	17		0,54 – 0,68
Reintroducirane populacije (Švicarska, Njemačka, HR, SLO, BiH)	BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a.)	17		0,42-0,61
Karpati	BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a.)	17	4,6	0,62
Poljska, Latvija i Estonija	SCHMIDT i sur. (2009.)	6	6,7	0,68

* analizirano samo 7 uzoraka

Ris iz Hrvatske ima najniži srednji broj alela po lokusu (osim uzoraka iz Češke autora RUENESS i sur. (2003.), no oni su analizirali samo 7 uzoraka) i najnižu heterozigotnost od svih do sada istraženih populacija euroazijskog risa. Heterozigotnost uzoraka iz Hrvatske dobivena u ovom istraživanju je na nižoj granici prosječne heterozigotnosti reintroduciranih populacija koje su istražili BREITENMOSER – WÜRSTEN i OBEXER – RUFF (2003a.). Isti autori su u svom istraživanju analizirali 20 uzoraka iz više zemljama koje pokriva karpatska populacija, te utvrdili sličan srednji broj alela dobiven u ovom istraživanju za uzorke iz Slovačke, no veću heterozigotnost (0,62 u

odnosu 0,565), što je vjerojatno posljedica toga što uzorci karpatske populacije u ovom istraživanju potječu iz samo jedne zemlje.

Kada se odvojeno analiziraju uzorci risa iz Hrvatske prikupljeni do 2000. i nakon 2000. godine uočava se gubitak genske raznolikosti u posljednjih 10 godina. Prosječan broj alela po lokusu pao je s 3,05 na 2,6 dok je izgubljeno ukupno 10 alela na 7 mikrosatelitnih lokusa.

5.6 Usporedba s ostalim vrstama

Da bi se stekao dojam o rasponima vrijednosti parametara genske raznolikosti risa iz Hrvatske, usporedila sam podatke dobivene ovim istraživanjem s podacima nekoliko ugroženih predstavnika porodice mačaka za koje je dokazano da je parenje u srodstvu uzrokovalo pad sposobnosti preživljavanja. Iako je ovakva usporedba ograničenog karaktera, upućuje nas na značenje dobivenih podataka.

Reintrodukcija pume na Floridu klasičan je primjer zaštite i upravljanja ugroženom vrstom na temelju podataka dobivenih istraživanjem populacijske genetike. Podvrsta puma iz Floride (*Puma concolor coryi*) ima ograničeno stanište na istoku Sjeverne Amerike (oko Miamia), te je početkom 1990-ih populacija svedena na 20 – 25 odraslih jedinki koje su očitovale smanjenu gensku raznolikost kao posljedicu parenja u srodstvu. Populacija iz 80-ih imala je jedan haplotip mitohondrijske DNA (prije redukcije veličine prisutna su bila najmanje 3 haplotipa) te je očekivana heterozigotnost 10 mikrosatelitskih lokusa bila 0,147 (CULVER i sur., 2008.). DRISCOLL i sur. (2002.) istražili su raznolikost 90 mikrosatelitnih lokusa i utvrdili očekivanu i uočenu heterozigotnost od 0,17 odnosno 0,19, te 1,51 prosječan broj alela po lokusu. Istraživanja su dokazala da je parenje u srodstvu kod populacije uzrokovalo slabiju kvalitetu sperme, nižu razinu testosterona, pad reproduktivnog kapaciteta, kriptorhizam u više od 80% mužjaka, defekte srčanih zalistaka, te povećanu učestalost parazitarnih i zaraznih oboljenja (JOHNSON i sur., 2010.). Budući da su demografski modeli predviđali 95% vjerojatnost izumiranja populacije u roku od dvije godine, 1995. godine provedena je reintrodukcija. Reintroducirano je 8 jedinki iz Texasa, koje su naseljene na područje koje je nastanjivala populacija od 26 puma (populacije u Floridi i Texasu su nekoć bile povezane). Do 2003. godine zabilježen je prosječan pomladak od 26.6 mladunca godišnje, širenje staništa i porast gustoće naseljenosti, a ukupna veličina populacije je rasla 14% godišnje, te dosegla brojku od 95 odraslih jedinki. Zabilježen je porast heterozigotnosti, niža prosječna dob odraslih

jedinki, povećan postotak preživljavanja mladunčadi koji su nastali parenjem reintrodotiranih i autohtonih životinja u usporedbi s potomcima autohtonih životinja, te je povećan postotak preživljavanja odraslih jedinki. Reintrodukcija se smatra iznimno uspješnom, brojnost populacije je narasla tri puta, došlo je do porasta genske raznolikosti i sposobnosti preživljavanja te se očituje redukcija u ispoljavanju fenotipskih karakteristika za koje se smatralo da su nastale kao posljedica parenja u srodstvu.

Iberijski ris (*Lynx pardina*) najugroženija je mačka svijeta, koja je opstala samo u dvije izolirane populacije u Španjolskoj te se provodi uzgoj životinja u zatočeništvu i njihovo puštanje u prirodu da bi se osigurao opstanak vrste. Istraživanja su pokazala da je srednji broj alela po lokusu iberijskog risa 2,05 te da je od 28 istraženih lokusa tek 86% njih polimorfno (JOHNSON i sur., 2004.).

Amurski leopard (*Panthera pardus orientalis*) kritično je ugrožena podvrsta leoparda prisutna samo na istoku Rusije, a smatra se da populaciju čini 25 do 40 životinja. Istraživanje 25 mikrosatelitskih lokusa pokazalo je 80%-tnu polimorfnost, srednji broj alela 2,32 te efektivni broj alela 1,7 dok je srednja vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,402. U populaciji je prisutan samo jedan haplotip mitohondrijske DNA. Amurski leopard očituje najnižu gensku raznolikost od svih do sada istraženih podvrsta i populacija leoparda te se smatra da je opstanak populacije ozbiljno ugrožen i sukladno tome predlaže se naseljavanje novih jedinki da bi se osigurao opstanak populacije (UPHYRKINA i sur. 2002.).

DRISCOLL i sur. (2002.) istražili su raznolikost 90 mikrosatelitnih lokusa više populacija geparda, lava i puma, među kojima i populaciju lavova iz Ngorongoro kratera. Ta populacija je doživjela usko grlo te se procjenjuje da je 1962. godine spala na 10 do 15 jedinki, no tijekom 1970-ih se oporavila. Dokazano je da mužjaci pate od slabije kvalitete sperme, nastale kao posljedica parenja u srodstvu (PACKER i sur., 1991). Populacija danas očituje uočenu heterozigotnost od 0,48 s prosječnim brojem alela po lokusu 2,86 (DRISCOLL i sur., 2002.).

Iz ovog prikaza uočljivo je da se kod mačaka, koje imaju sličnu demografsku sliku i povijest kao ris u Hrvatskoj te slične vrijednosti genske raznolikosti, očituju negativne posljedice parenja u srodstvu. Posljedice se prvenstveno očituju kao pad sposobnosti razmnožavanja te pojavom nepoželjnih promjena morfoloških obilježja.

Zbog ograničenog opsega istraživanja risa u Hrvatskoj i niske brojnosti populacije izuzetno rijetko imamo mogućnosti pregleda živih ili mrtvih životinja. U Hrvatskoj još nemamo znanstvenu potvrdu negativnog utjecaja parenja u srodstvu na sposobnost preživljavanja u vidu dokazanih

morfoloških promjena (kao što su hipoplazija testisa, deformacije kostiju ili promjene na srčanim zaliscima). No pregledom podataka za vrste kod kojih je to dokazano uočavamo sličnosti u vrijednostima genske raznolikosti te sličnosti u demografskoj slici. Stoga sukladno iskustvu s Floridskom panterom i ostalim vrstama smatram da je očita potreba za unošenjem novih jedinki na područje rasprostranjenosti risa u Hrvatskoj.

6. Zaključci

1. Kontrolna regija mitohondrijske DNA svih analiziranih uzoraka dinarske (Hrvatska, Slovenija, Bosna i Hercegovina) i karpatske populacije (Slovačka) pripadaju istom haplotipu koji je identičan haplotipu euroazijskih risova iz baltičkih zemalja, Karpata te iz reintroducirane švicarske populacije. Takav rezultat je logičan budući su populacije u Dinaridima i Alpama nastale reintrodukcijom malog broja životinja iz Karpatske populacije.
2. Kod 60 uzorka euroazijskog risa iz Hrvatske na 20 mikrosatelitskih lokusa utvrđena je prisutnost ukupno 62 alela, a srednji broj alela po lokusu je iznosio 3,1. Alelna bogatstvo risa iz Hrvatske iznosi 3,049 te efektivan broj alela iznosi 2,113. Uočena heterozigotnost (genska raznolikost) risa iz Hrvatske iznosi 0,435 a očekivana heterozigotnost 0,490. Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže među hrvatskim uzorcima pronađeno je na tri lokusa.
3. Srednja vrijednost koeficijenta križanja u srodstvu za uzorke iz Hrvatske iznosi 0,093 (vrijednost 0,0625 ukazuje da su roditelji jedinke rođaci u prvom koljenu).
4. Pri usporedbi uzoraka iz Hrvatske prikupljenih do 2000. i nakon 2000. godine očituje se dodatni gubitak genske raznolikosti u posljednjih deset godina. Svi lokusi na uzorcima prikupljenim do 2000. godine su polimorfni, dok se nakon 2000. dva lokusa (Fca723 i Fca001) javljaju kao monomorfni. Prosječan broj alela do 2000. iznosi 3,05 dok nakon 2000. godine prosječan broj alela po lokusu pada na 2,6. Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u među uzorcima do 2000. godine pronađeno je na dva lokusa (Fca742 i Fca567), a nakon 2000., osim dva monomorfna lokusa ukupno 3 lokusa značajno odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Efektivan broj alela do 2000. godine je iznosio 2,104 a nakon 2000. godine 1,939. Alelna bogatstvo za hrvatske uzorke prikupljene do 2000. godine je iznosilo 2,964 dok je za uzorke nakon 2000. iznosilo 2,572. Dobiveni podatci su orijentacijskog karaktera budući je analiziran mali broj uzoraka prikupljenih nakon 2000. godine te ti uzorci ne pokrivaju cijelo područje rasprostranjenosti risa u Hrvatskoj.
5. Unutar populacije risa u Hrvatskoj nije došlo do podjele na subpopulacije tj. fragmetacija staništa i ostale barijere kretanju risova nisu dovele do odvajanja populacije u grupe.

6. Populacija risa iz Hrvatske ima najniže vrijednosti parametara genske raznolikosti od svih do sada istraženih populacija risa, te znatno niže vrijednosti u usporedbi s autohtonom populacijom iz Karpatima odakle potječe.
7. U Hrvatskoj još nemamo znanstvenu potvrdu negativnog utjecaja parenja u srodstvu na sposobnost preživljavanja u vidu dokazanih morfoloških promjena (kao što su hipoplazija testisa, deformacije kostiju ili promjene na srčanim zaliscima), no pregledom podataka za vrste mačaka kod kojih je to dokazano uočavamo sličnosti u vrijednostima genske raznolikosti te sličnosti u demografskoj slici.
8. Posljedice uskog grla i parenja u srodstvu kod risa u Hrvatskoj očituju se znatnim gubitkom genske raznolikosti, te se zbog izoliranosti od ostalih populacija reintrodukcija novih jedinki predlaže kao jedino moguće rješenje za obnovu genske raznolikosti i osiguranje opstanka populacije u Dinaridima.
9. Budući je populacija risa u Dinaridima nastala reintrodukcijom jedinki iz Slovačke smatramo da je populacija risa u Karpatima najbolji izvor jedinki za ponovnu reintrodukciju. Populacija u Karpatima zadržala je visoke vrijednosti genske raznolikosti, no još uvijek s dinarskom populacijom dijeli dio zajedničkih alela.
10. Naseljavanje bi trebalo provesti u suradnji sa Slovenijom te Bosnom i Hercegovinom, zemljama s kojima dijelimo Dinarsku populaciju risa.

7. Literatura

- AASEN, E., J. F. MEDRANO (1990): Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8, 1279-1281.
- ALLENDORF, F. W., R. F. LEARY (1986): Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. U: *Conservation biology: the science of scarcity and diversity* (Soulé, M. E. ur.). Sinauer. Sunderland. str. 57–76.
- ALLENDORF, F. W. (2002): Genetics aspects of viability in small populations with special emphasis on the Scandinavian wolf populatin. U: *Genetics and the Persistence of Small Populations. Report from an International Expert Workshop* (Liberg, O., ur.). Farna. Herrgard. str. 44.
- ASHWORTH, D., M. BISHOP, K. CAMPBELL, A. COLMAN, A. KIND, A. SCHNIEKE, S. BLOTT, H. GRIFFIN, C. HALEY, J. MCWHIR, I. WILMUT (1998): DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329.
- AVISE, J. C. (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman & Hall. New York, London.
- AVISE, J. C. (2004): *The hope, hype, and reality of genetic engineering*, Oxford University Press. New York.
- BELLEMAIN, E., P. TABERLET (2004): Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) feces. *Mol. Ecol. Notes* 4, 519-522.
- BERLIN, I. (2007): *Tracking an elusive predator: Studying the Scandinavian lynx population by use of genetic markers*. Disertacija. Sveučilište Uppsala. Uppsala, Švedska.
- BÉRUBÉ, M., P. PALSBOÛLL (1996.): Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Mol. Ecol.* 5, 283-287.
- BONIN, A., E. BELLEMAIN, P. B. EIDENSEN, F. POMPANON, C. BROCHMANN, P. TABERLET (2004): How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261–3273.
- BRADLEY, B. J., K. E. CHAMBERS, L. VIGILANT (2001.): Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conserv. Genet.* 2, 179-181.

- BREITENMOSER, U., H. HALLER (1987): Nahrungsökologie des Luches *Lynx lynx* in den schweizerischen Nordalpen. *Z. Säugetierk.* 52, 168-191.
- BREITENMOSER, U., C. BREITENMOSER – WÜRSTEN, S. CAPT (1998): Re-introduction and present status of lynx (*Lynx lynx*) in Switzerland. *Hystrix* 10, 17-30.
- BREITENMOSER, U., C. BREITENMOSER-WÜRSTEN, H. OKARMA, T. KAPHEGYI, U. KAPHEGYI-WALLMANN, U. M. MÜLLER (2000): Action plan for the conservation of the Eurasian lynx in Europe (*Lynx lynx*), Council of Europe Publishing. Strasbourg Cedex.
- BREITENMOSER – WÜRSTEN, C., G. OBEXER – RUFF (2003a): Population and conservation genetics of two re-introduced lynx (*Lynx lynx*) populations in Switzerland – A molecular evaluation 25 years after translocation, Progress report, KORA Bericht, Bern.
- BREITENMOSER-WÜRSTEN C., G. OBEXER - RUFF (2003b): Population and conservation genetics of two re-introduced lynx (*Lynx lynx* L.) populations in Switzerland – a molecular evaluation 30 years after translocation. Proceedings of Second conference on the Status and Conservation of the Alpine Lynx Population, 7-9 May 2003. Amden, Switzerland.
- BROQUET, T., N. MENARD, E. PETIT (2007): Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conserv. Genet.* 8, 249-260.
- BROWN, W. M. (1985): The mitochondrial genome of animals. U: Evolution of genes and proteins (MacIntyre, R. J., ur.). Plenum Press. New York. str. 95-130.
- BRUFORD, M. W., R. K. WAYNE (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 939-943.
- BUROKER, N. E., J. R. BROWN, T. A. GILBERT, P. J. OHARA, A. T. BECKENBACH, W. K. THOMAS, M. J. SMITH (1990): Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial-DNA, An illegitimate elongation model. *Genetics* 124, 157–163.
- BUTLER, J. M., V. A. DAVID, S. J. O'BRIEN, M. MENOTTI-RAYMOND (2002): The MeowPlex: A new DNA test using tetranucleotide STR markers for the domestic cat. *Profiles in DNA* 5, 7-10, 2002.

- CAMPBELL, V., C. STROBECK (2006): Fine-scale genetic structure and dispersal in Canada lynx (*Lynx canadensis*) within Alberta, Canada. *Can. J. Zool.* 84, 1112-1119.
- CARMICHAEL, L. E., W. CLARK, C. STROBECK (2000): Development and characterization of microsatellite loci from lynx (*Lynx canadensis*), and their use in other felids. *Mol. Ecol.* 9, 2197-2198.
- CASANE, D., N. DENNEBOUY, H. DE ROCHAMBEAU, J. C. MOUNOLOU, M. MONNEROT (1997): Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of Lagomorphs. *Mol. Biol. Evol.* 14, 779-789.
- CASAS-MARCE, M., E. REVILLA, J. A. GODOY (2010): Searching for DNA in museum specimens: a comparison of sources in a mammal species. *Mol. Ecol. Res.* 10, 502-507.
- CLAYTON, D. A. (1991): Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* 7, 453-478.
- COLTMAN, D. W., W. D. BOWEN, J. M. WRIGHT (1998): Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *P. Roy. Soc. L. B* 265, 803-809.
- COLTMAN, D. W., J. G. PILKINGTON, J. A. SMITH, J. M. PEMBERTON (1999): Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living island population. *Evolution* 53, 1259-1267.
- CONNER, J. D., D. L. HARTL (2004): *A primer of ecological genetics*, Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- COOPER, G. M., R. E. HAUSMAN (2004): *Stanica – molekularni pristup, treće izdanje* (G. Lauc, urednik), Medicinska naklada. Zagreb.
- CORNUET, J. M., G. LUIKART (1996): Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.
- CRNOKRAK, P., D. A. ROFF (1999): Inbreeding depression in the wild. *Heredity* 83, 260-270.
- CULVER, M., P.W. HEDRICK, K. MURPHY, S.J. O'BRIEN, M.G. HORNOCKER (2008): Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *An. Conserv.* 11, 104-110.

- DALIN, E. (2007): Species and individual determination in Wolf and Lynx Using Single Nucleotide Polymorphisms and Short Tandem Repeats. Project in microbial biotechnology. Institute of technology Linköping University. Linköping.
- DEWOODY, J. A., J. C. AVISE (2000): Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56, 461–473.
- DI RIENZO A, A. C. PETERSON, J. C. GARZA, A. M. VALDES, M. SLATKIN, N. B. FREIMER (1994): Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3166-3170.
- DRISCOLL, C. A., M. MENOTTI-RAYMOND, G. NELSON, D. GOLDSTEIN, S. J. O'BRIEN (2002): Genomic microsatellites as evolutionary chronometers: a test in wild cats. *Genome Res.* 12(3), 414-23.
- EBERHARD, J. R., T. F. WRIGHT, E. BERMINGHAM (2001): Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Mol. Biol. Evol.* 18,1330–1342.
- ELLEGREN, H., P. SAVOLAINEN, B. ROSÉN (1996): The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: a study using nuclear and mitochondrial polymorphisms. *Philos. Trans. R. Soc. London, Series B* 351 (1348), 1661-1669.
- ELLEGREN, H. (1999): Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas* 130, 239-244.
- ELLEGREN, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics* 5, 435-445.
- ELLEGREN, H. (2009a): The different levels of genetic diversity in sex chromosomes and autosomes. *Trends Genet.* 25(6), 278-284.
- ELLEGREN, H. (2009b): Is genetic diversity really higher in large populations? *J. Biol.* 8(41),1-3.
- EVANNO, G., S. REGNAUT, J. GOUDET (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, S. SCHNEIDER (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.

- FALCONER, D. S., T. F. MACKAY (1996): Introduction to quantitative genetics, 4th ed., Longman. Essex.
- FALUSH, D., M. STEPHENS, J. K. PRITCHARD (2003): Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- FERRANDO, A., M. PONSÀ, J. MARMI, X. DOMINGO-ROURA (2004): Eurasian Otters, *Lutra lutra*, Have a Dominant mtDNA Haplotype From the Iberian Peninsula to Scandinavia. *J. Hered.* 95 (5), 430-435.
- FRANKEL, O. H., M. E. SOULE (urednici) (1981): Conservation and evolution, Cambridge University Press. Cambridge.
- FRANKHAM, R. (1995): Conservation genetics. *Annu. Rev. Genet.* 29, 305-327.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, D. A. BRISCOE (2002): Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press. Cambridge.
- FRANKHAM, R. (2005): Genetics and extinction. *Biol. Cons.* 126, 131-140.
- FRANTZEN, M. A. J., J. B. SILK, J. W. H. FERGUSON, R. K. WAYNE, M. H. KOHN (1998): Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* 7, 1423-1428.
- FREDHOLM, M., A. K. WINTERØ (1996a): Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim. Genet.* 27, 19-23.
- FREDHOLM, M., A. K. WINTERØ (1996b): Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm. Genome* 6, 11-18.
- FREELAND, J. L. (2005): Molecular ecology, John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, New York.
- FREEMAN, A. R., D. E. MACHUGH, S. N. MCKEOWN, C. WALZER, D. J. MCCONNELL, D. G. BRADLEY (2001): Sequence variation in the mitochondrial DNA control region of wild African cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Heredity* 86, 355-362.
- FRKOVIĆ, A. (1998): Ponovo naseljavanje i ulov risa (*Lynx lynx* L.) u Županiji Primorsko-Goranskoj u razdoblju od 1974.-1996. godine. Zbornik radova Prirodoslovna istraživanja Riječkog područja, Prirodoslovni muzej Rijeka. str. 493 - 500.

- FRKOVIĆ, A. (2002): Risovica "Bela" obilježena radioogrlicom. *Priroda* 92, 36-40.
- FRKOVIĆ, A. (2003): Ris u Hrvatskoj. Primorsko-goranska županija, Upravni odjel za gospodarski razvoj i Lovački savez Primorsko-goranske županije. Rijeka.
- GALTIER, N., B. NABHOLZ, S. GLEMIN, G. D. D. HURST (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541-4550.
- GEMMELL, N. J., P. S. WESTERN, J. M. WATSON, J. A. GRAVES (1996): Evolution of the mammalian mitochondrial control region-comparisons of control region sequences between monotreme and therian mammals. *Mol. Biol. Evol.* 13,798–808.
- GILLESPIE, J. H. (2004): Population genetics: a concise guide, The John Hopkins University Press. Baltimore.
- GILSON, A., M. SYVANEN, K. LEVINE, J. BANKS (1998.): Deer gender determination by polymerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Fish and Game* 84, 159-169.
- GOMERČIĆ, T., M. ĐURAS (2002.): Bela-prvi naš ris s radioodašiljačem. *Lovački vjesnik*, 111 (3), 38.
- GOMERČIĆ, T. (2005): Kraniometrijske i druge značajke populacije euroazijskog risa (*Lynx Lynx* L.) u Hrvatskoj. Magistarski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- GOMERČIĆ, T., Ž. GOTTSTEIN, I. SADARIĆ, J. SADARIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. GALOV, Đ. HUBER (2006): Kontrolna regija mitohondrijske DNA euroazijskog risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske. Zbornik sažetaka 9. hrvatskog biološkog kongresa, 23.-29. rujna. Rovinj, Hrvatska. str. 308-310.
- GOMERČIĆ, T., G. GUŽVICA, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. FRKOVIĆ, D. PAVLOVIĆ, J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER (2009): Variation in teeth number, teeth and skull disorders in Eurasian lynx, *Lynx lynx* from Croatia. *Fol. Zool.* 58(1): 57-65.

- GOMERČIĆ, T., M. SINDIČIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, G. GUŽVICA, A. FRKOVIĆ, D. PAVLOVIĆ, J. KUSAK, A. GALOV, Đ. HUBER (2010): Cranial morphometry of the Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) from Croatia. *Vet. arhiv* 80 (3), 393-410.
- GOODWIN, W., A. LINACRE, S. HADI (2007): *An introduction to forensic genetics*, John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, New York.
- GOUDET, J. (2001): FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GUGOLZ, D., M. V. BERNASCONI, C. BREITENMOSER – WÜRSTEN, P. WANDELER (2008): Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *J. zool.* 275(2), 201-208.
- GUŽVICA, G. (1996): *Komparativna analiza velikih fosilnih zvijeri (Carnivora) gornjeg pleistocena sjeverozapadne Hrvatske*. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- HAGELBERG, E., I. C. GRAY, A. J. JEFFREYS (1991): Identification of skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352, 427-429.
- HALL, L. M., M. S. WILLCOX, D. S. JONES (1996): Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. *BioTechniques* 22, 928–934.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- HANCOCK, J. M. (1999): *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. *U: Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B., C. Schlötterer, urednici). Oxford University Press. New York. str. 1-9.
- HANSSON, B., L. WESTERBERG (2002): On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.* 11, 2467-2474.
- HEDMARK, E., H. ELLEGREN (2005): Microsatellite genotyping of DNA isolated from claws left on tanned carnivore hides. *Int. J. Legal. Med.* 119, 370–373.

- HEDRICK, P., S. MILLER (1992): Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. App.* 2, 30–46.
- HEDRICK, P. (2002): Inbreeding depression in conservation biology. U: *Genetics Aspects of Viability in Small Populations with Special Emphasis on the Scandinavian Wolf Populatin*. Report from an International Expert Workshop (Liberg, O. ur.). Farna Herrgard, Sweeden. str. 43.
- HEDRICK, P. W. (2000): *Genetics of populations*, 2nd ed., Jones and Bartlet Publishers. Sudbury.
- HELLBORG, L., C.W. WALKER, E.K. RUENESS, J.E. STACY, I. KOJOLA, H. VALDMANN, C. VILA, B. ZIMMERMANN, K.S. JAKOBSEN, H. ELLEGREN (2002): Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conserv. Genet.* 3, 97–111.
- HEMMER, H. (1993): *Felis (Lynx) lynx* – Luchs, Nordluchs. U: *Handbuch der Säugetiere Europas* (Niethammer J., Krapp F., urednici). Aula. Wiesbaden. str. 1119-1168.
- HERFINDAL, I., J. D. C. LINNELL, J. ODDEN, E. BIRKELAND NILSEN, R. ANDERSEN (2005): Prey density, environmental productivity and home-range size in the Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *J. Zool.* 265, 63-71.
- HERTWIG, S. T., M. SCHWEIZER, S. STEPANOW, A. JUNGNICHEL, U.-R. BÖHLE, M. S. FISCHER (2009): Regionally high rates of hybridization and introgression in German wildcat populations (*Felis silvestris*, Carnivora, Felidae). *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 47 (3); 283-297.
- HEY, J. (2000): Human mitochondrial DNA recombination: can it be true? *Trends Ecol. Evolut.* 15, 181-182.
- HILLIS, D. M., B. K. MABLE, A LARSON, S. K. DAVIS, E. A. ZIMMER (1996): Nucleic acids IV: sequencing and cloning. U *Molecular Systematics*, 2nd edition (Hillis, D. M., C. Moritz, B. K. Mable, urednici). Sinauer Associates, Inc. Sunderland. str. 321-378.
- HIRC, D. (1898): Gorski kotar. Zagreb. str 1-175.

- HOELZEL, A. R. (1993): Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Curr. Opin. Genetics. Dev.* 3, 891-895.
- HOELZEL, A. R., J. V. LOPEZ, G. A. DOVER, S. J. O'BRIEN (1994): Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *J. Mol. Evol.* 39, 191-199.
- JAE-HEUP, K., E. EIZIRIK, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2001): Structure and patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. *Mitochondrion* 14, 279-292.
- JANKE, A., G. FUCHS-FELDMAIER, W. KELLY THOMAS, A. VON HAESLER, S. J. O'BRIEN (1994): The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137, 243-256.
- JARNE, P., P. J. L. LAGODA (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-429.
- JEFFREYS, A. J., V. WILSON, S. L. THEIN (1985): Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- JOHNSON, W. E., J. A. GODOY, F. PALOMARES, M. DELIBES, M. FERNANDES, E. REVILLA, S. J. O'BRIEN (2004): Phylogenetic and Phylogeographic Analysis of Iberian Lynx Populations. *J. Heredity* 95(1), 19-28.
- JOHNSON, W. E., E. EIZIRIK, J. PECON-SLATTERY, W. J. MURPHY, A. ANTUNES, E. TEELING, S. J. O'BRIEN (2006): The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science* 311(5757): 73-77.
- JOHNSON, W. E., D. P. ONORATO, M. E. ROELKE, E. D. LAND, M. CUNNINGHAM, R. C. BELDEN, R. MCBRIDE, D. JANSEN, M. LOTZ, D. SHINDLE, J. HOWARD, D. E. WILDT, L. M. PENFOLD, J. A. HOSTETLER, M. K. OLI, S. J. O'BRIEN (2010): Genetic restoration of the Florida panther. *Science* 328, 1641-1645.
- JORDE, P. E., E. K. RUENESS, N. C. STENSETH, K. S. JAKOBSEN (2006): Cryptic population structuring in Scandinavian lynx: reply to Pamilo. *Mol. Ecol.* 15, 1189-1192.

- KACZENSKY, O., T. HUBER (1997): Čije je to djelo? Priručnik za prepoznavanje tragova predatora na žrtvi. Ministarstvo kulture Republike Hrvatske, Uprava za zaštitu kulturne i prirodne baštine, Zagreb.
- KASHI, Y., M. SOLLER (1999): Functional roles of microsatellites and minisatellites. U: *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B., C. Schlötterer, urednici). Oxford University Press. Oxford. str. 10-23.
- KELLER, L. F., D. M. WALLER (2002): Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230-241.
- KIMURA, M., J. F. CROW (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-738.
- KIMURA, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F. X. VILLABLANCA, A. C. WILSON (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196-6200.
- KORITNIK M. (1974): Še nekaj o risu. *Lovec* 67,198-199.
- KOS, F. (1928): Ris (*Lynx lynx*) na ozemlju etnografske Slovenije. *Glasnik muzejskega društva za Slovenijo*. 1(1-4), 57-72.
- KOS, I., H. POTOČNIK, T. SKRBINŠEK; A. SKRBINŠEK MAJIĆ, M. JONOZOVIČ, M. KROFEL (2005): Ris v Sloveniji: strokovna izhodišča za varstvo in upravljanje. 2. dopolnjena izdanje, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta. Ljubljana.
- KRATOCHVIL, J. (1968): Survey of the distribution of populations of the genus *Lynx* in Europe. *Acta Sc. Nat. Brno* 2(4), 5-12.
- KRATOCHVIL, J., F. VALA (1968): History of occurrence of the *Lynx* in Bohemia and Moravia. *Acta Sc. Nat. Brno* 2(4), 33-48.

- KURTÉN, B. (1968): Pleistocene Mammals of Europe. Weidenfeld and Nicolson. London, UK.
- KURTÉN, B., E. GRANQVIST (1987): Fossil pardel lynx (*Lynx pardina spelaea* Boule) from a cave in southern France. *Ann. Zool. Fenn.* 24, 39-43.
- KVAM, T. (1990): Population biology of the European lynx (*Lynx lynx*) in Norway. Dr. scientific thesis. University of Trondheim. Trondheim, Norway.
- KVAM, T. (1991): Reproduction in the European lynx, *Lynx lynx*. *Z. Säugetierkunde* 56, 146-158.
- LACY, R. C., G. ALAKS, A. WALSH (1996): Hierarchical analysis of inbreeding depression in *Peromyscus polionotus*. *Evolution* 50, 2187–2200.
- LACY, R. C. (1997): Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J. Mamm.* 78, 320–335.
- LAIKRE, L., R. ANDREN, H. O. LARSSON, N. RYMAN (1996): Inbreeding depression in brown bear *Ursus arctos*. *Biol. Conserv.* 76, 69-72.
- LAIKRE, L. (1999): Conservation genetics of Nordic carnivores: lessons from zoos. *Hereditas* 130: 203-216.
- LI, Y-C., A. B. KOROL, T. FAHIMA. A. BEILES, E. NEVO (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.
- LINNELL, J., V. SALVATORI, L. BOITANI (2007): Guidelines for Population Level Management Plans for Large Carnivores, Large Carnivore Initiative for Europe (LCIE) by contract for EC. Rome.
- LOPEZ, J. V., S. CEVARIO, S. J. O'BRIEN (1996): Complete Nucleotide Sequences of the Domestic Cat (*Felis catus*) Mitochondrial Genome and a Transposed mtDNA Tandem Repeat (*Numt*) in the Nuclear Genome. *Genomics* 33, 229–246.
- LUCCHINI, V., A. GALOV, E. RANDI (2004): Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol. Ecol.* 13, 523-536.

- MAJIĆ SKRBINŠEK, A., T. SKRBINŠEK, M. SINDIČIĆ, M. KROFEL, Đ. HUBER, J. KUSAK, H. POTOČNIK, I. KOS (2008): Proposal for common lynx strategy for Slovenia and Croatia. DinaRis projekt. Ljubljana, Zagreb.
- MAJIĆ, A. (urednik) (2004): Plan upravljanja risom u Hrvatskoj. Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja Republike Hrvatske. Zagreb.
- MALEZ, M. (1986): Kwartarni sisavci (Mammalia) iz Velike pećine na Ravnoj gori (SR Hrvatska, Jugoslavija). Radovi Zavoda za znanstveni rad JAZU, 1, 33-139.
- MALNAR, J. (2010): Gorski krvolok. Dobra kob 109, 29.
- MATJUŠKIN, E. N. (1978): Der Luchs Lynx lynx. Die Neue Brehm-Bucherei 517, 160.
- MATSON, C. W., R. J. BAKER (2001): DNA sequence variation in the mitochondrial control region of redbacked voles (*Clethrionomys*). Mol. Biol. Evol. 18, 1494–1501.
- MCKELVEY, S., J. VON KIENAST, K. B. AUBRY, G. M. KOEHLER, B. T. MALETZKE, J. R. SQUIRES, E. L. LINDQUIST, S. LOCH, M. K. SCHWARTZ (2006): DNA Analysis of Hair and Scat Collected Along Snow Tracks to Document the Presence of Canada Lynx. Wildlife S. B. 34(2), 451-455.
- MENOTTI-RAYMOND, M. A., S. J. O'BRIEN (1999): Evolutionary Conservation of Ten Microsatellite Loci in Four Species of Felidae. J. Hered. 86,319-322.
- MEYER, A., T. D. KOCHER, P. BASASIBWAKI, A. C. WILSON (1990): Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. Nature 347, 550–553.
- MILLS, L. S., K. L. PILGRIM, M. K. SCHWARTZ, K. S. MCKELVEY (2000): Identifying lynx and other North American cat species based on mtDNA analysis. Conserv. Genet. 1, 285-288.
- MORIN, P. A., G. LUIKART, R. K. WAYNE, and THE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM WORKSHOP GROUP (2004): SNPs in ecology, evolution, and conservation. Trends Ecol. Evol. 19, 208–216.

- MOXON, E. R., C. WILLS (1999): DNA microsatellites: agents of evolution? *Sc. Amer.* January, 72-77.
- NABHOLZ, B., J. MAUFFREY, E. BAZIN, N. GALTIER, S. GLEMIN (2007): Determination of Mitochondrial Genetic Diversity in mammals. *Genetics* 178, 351–361.
- NAKAHORI, Y., K. HAMANO, M. IWAYA, Y. NAKAGOME (1991): Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics* 39: 472-473.
- NAKAMURA, Y., M. LEPPERT, P. O'CONNELL, R. WOLFF, T. HOLM, M. CULVER, C. MARTIN, E. FUJIMOTO, M. HOFF, E. KUMLIN, R. WHITE (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622.
- NEFF, B. D., M. R. GROSS (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55, 1717-1733.
- NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3321–3323.
- OHTA, T, M. KIMURA (1973): A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* 22, 201-204.
- PACKER, C., A. E. PUSEY, H. ROWLEY, D. A. GILBERT, J. MARTENSON, S. J. O'BRIEN (1991): Case Study of a Population Bottleneck: Lions of the Ngorongoro Crater. *Conserv. Biol.* 5, 219-230.
- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998): *Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach*, Blackwell Science. Oxford.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002.): Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11, 2171–2182.
- PAMILO, P. (2004): How cryptic is the Scandinavian lynx? *Mol. Ecol.* 13, 3257-3259.
- PEAKALL, R., P.E. SMOUSE (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288-295.

- PERTOLDI, C., R. GARCIA-PEREA, J. A. GODOY, M. DELIBES, V. LOESCHCKE (2006): Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J. Zool.* 268, 73-86.
- PIRY, S., G. LUIKART, J.-M. CORNUET (1999) : Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90, 502–503.
- POLANC, P. (2003): Analiza mitohondrijske DNA populacije risa (*Lynx lynx* L.) v Sloveniji. Diplomski rad. Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo Univerzitet v Ljubljani. Ljubljana, Slovenija.
- PRITCHARDA, J. K., X. WENA, D. FALUSHB (2007): Documentation for structure software: Version 2.2. University of Oxford. Oxford, UK.
- PURDUE, J. R., T. K. OLEKSYK, M. H. SMITH (2006): Independent occurrences of multiple repeats in the control region of mitochondrial DNA of white-tailed deer. *J. Hered.* 97, 235–243.
- RAJKOVIĆ, J., J. ČOP, Z. KOZARIĆ, Đ. HUBER (2000): Analiza prehrane risa u Hrvatskoj i Sloveniji. Zbornik sažetaka sedmog hrvatskog biološkog kongresa, 24. – 29. rujna. Hvar, Hrvatska. str.312-313.
- RALLS, K., J. BALLOU (1983): Extinction: lessons from zoos. U *Genetics and conservation; a reference for managing wild animals and plant populations* (Schonewald – Cox, C. M., S. M. Chambers, B. MacBryde, L. Thomas, urednici). Benjamin/Cummings. Menlo Park, CA. str. 164-184.
- REED, D. H., R. FRANKHAM (2003): Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* 17, 230-237.
- ROLDAN, E. R. S., J. CASSINELLO, T. ABAIGAR, M. GOMENDIO (1997): Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc. R. Soc. L. B* 265, 243–248.
- RUENESS, E. K., P. E. JORDE, L. HELLBORG, N. C. STENSETH, H. ELLEGREN, K. S. JAKOBSEN (2003a): Cryptic population structure in a large, mobile mammalian predator: the Scandinavian lynx. *Mol. Ecol.* 12, 2623–2633.

- N. C. STENSETH, M. O'DONOGHUE, S. BOUTIN, H. ELLEGREN, K. S. JAKOBSEN (2003b): Ecological and genetic spatial structuring in the Canadian lynx. *Nature* 425:69–72.
- RUENESS, E. K. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- SCHLÖTTERER, C. (1998): *Microsatellites. U: Molecular Genetic Analysis of Populations* (Hoelzel, A. R. urednik). Oxford University Press. New York, USA. str. 237-261.
- SCHMIDT, K. R. KOWALCZYK (2006): Using scent-marking stations to collect hair samples to monitor Eurasian lynx populations. *Wil. Soc. Bul.* 34, 462-466.
- SCHMIDT, K. R. KOWALCZYK, J. OZOLINS, P. MÄNNIL, J. FICKEL (2009): Genetic structure of the Eurasian lynx population in north-eastern Poland and the Baltic states. *Conserv. Genet.* 10, 497–501.
- SCHWARTZ, M. K., L. S. MILLS, K. S. MCKELVEY, L. F. RUGGIERO, F. W. ALLENDORF (2002): DNA reveals high dispersal synchronizing the population dynamics of Canada lynx. *Nature* 415,520–522.
- SCHWARTZ M. K., L. S. MILLS, Y. ORTEGA, L. F. RUGGIERO, F. W. ALLENDORF (2003): Landscape location affects genetic variation of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Mol. Ecol.* 12, 1807–1816.
- SCHWARTZ, M. K., K. L. PILGRIM, K. S. MCKELVEY, E. L. LINDQUIST, J. J. CLAAR, S. LOCH, AND L. F. RUGGIERO (2004): Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications. *Conserv. Genet.* 5, 5349-355.
- SEYMOUR, A. M., M. E. MONTGOMERY, B. H. COSTELLO, S. IHLE, G. JOHNSON, B. ST JOHN, D. TAGGART, B. A. HOULDEN (2001): High effective inbreeding coefficients correlate with morphological abnormalities in populations of South Australian koalas (*Phascolarctos cinereus*). *A. Conserv.* 4, 211–219.
- SIGNER, E. N., Y. E. DUBROVA, A. J. JEFFREYS, C. WILDE, L. M. B. FINCH, M. WELLS, M. PEAKER (1998): DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394, 329-330.
- SINANOVIĆ, N., M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER (2008): Status i perspektiva euroazijskog risa (*Lynx lynx*) u Bosni i Hercegovini. Knjiga kratkih sadržaja Šesti Simpozij poljoprivrede, veterinarstva, šumarstva i biotehnologije, 23.-26. listopada. Goražde, Bosna i Hercegovina. str. 29-30.

- SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, V. SLIJEPČEVIĆ, T. SKRBINŠEK, H. POTOČNIK (2007): Razvoj zamki za prikupljanje uzoraka dlaka risa (*Lynx lynx*). Zbornik sažetaka "Veterinarska znanost i struka". Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. p 19.
- SINDIČIĆ, M., A. FRKOVIĆ, Đ. HUBER, T. GOMERČIĆ, J. KUSAK (2008): Mortality of reintroduced Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Croatia. Book of abstracts of the 8th conference of the EWDA, 2.-5 October. Rovinj, Croatia. str 87.
- SINDIČIĆ, M. (2009a): Euroazijski ris leopard hrvatskih šuma. Meridijani 140, 60 – 66.
- SINDIČIĆ M. (2009b): Krivolov najvažniji uzrok pada brojnosti populacije risa. Dobra kob 95, 42-43.
- SINDIČIĆ, M., N. SINANOVIĆ, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, Đ. HUBER, S. KUNOVAC, I. KOS (2010a): Legal status and management of the Dinaric lynx population. Veterinaria 58(3-4), 229-238.
- SINDIČIĆ, M., A. ŠTRBENAC, P. OKOVIĆ (urednici) (2010b): Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj, za razdoblje od 2010. do 2015. Ministarstvo kulture.
- SLATE J., L. E. KRUUK, T. C. MARSHALL, J. M. PEMBERTON, T. H. CLUTTON-BROCK (2000): Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). Proc. R. Soc. L. B 267, 1657–1662.
- SLIJEPČEVIĆ, V. (2009): Telemetrijsko istraživanje euroazijskih risova (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- SLIJEPČEVIĆ, V., T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, J. KUSAK, Đ. HUBER (2009): Telemetry study of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Croatia. Zbornik sažetaka 10. hrvatskog biološkog kongresa, 14.-20. rujna. Osijek, Hrvatska. str. 188-189.
- SOLIGNAC, M., J. GEBNERMONT, M. MONNEROT, J.C. MOUNOLOU, (1987): Drosophila mitochondrial genetics: evolution of heteroplasmy through germ line cell divisions. Genetics 117, 687–696.

- SOMMER, R. S., N. BENECKE (2006): Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: a review. *J. Zool.* 269, 7-19.
- SPONG, G., L. HELLBORG (2002): A near – extinction event in lynx: do microsatellite data tell the tale? *Conserv. Ecol.* 6(1), 15.
- STARNER, H., C. PAHLSSON, M. LINDEN (2004): Tandem repeat polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Behaviour* 141,1357–1369.
- TABERLET, P. (1996): The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. *U Molecular Genetic Approaches in Conservation* (Smith, T. B., R. K. Wayne, urednici). Oxford University Press. New York. str. 125-142.
- TABERLET, P., L. P. WAITS, G. LUIKART (1999): Noninvasive genetic sampling: look before leap. *Tree* 14, 323-327.
- TAKAGI, A. P., S. ISHIKAWA, T. NAO, S. HORT, M. NAKATANI, M. NISHIDA, H. KUROKURA (2006): Tandem repeat sequence segments in control region of bronze featherback *Notopterus notopterus* mitochondrial DNA. *Fish Sci. J.* 72,1319–1321.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, S. KUMAR (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- TUMLISON, R. (1987): *Felis lynx*. *Mammalian sp.* 269, 1-8.
- UPHYRKINA, O., D. MIQUELLE, H. QUIGLEY, C. DRISCOLL, S. J. O'BRIEN (2002): Conservation Genetics of the Far Eastern Leopard (*Panthera pardus orientalis*). *J. Hered.* 93, 303–311.

- VÄLI, Ü., A. EINARSSON, L. WAITS, H. ELLEGREN (2008): To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Mol. Ecol.* 17, 3808–3817.
- VALIČRE, N. (2002): GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. Notes* 2, 377-379.
- VON ARX, M., C. BREITENMOSER-WÜRSTEN, F. ZIMMERMANN, U. BREITENMOSER (urednici) (2004): Status and conservation of the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Europe in 2001, KORA Bericht. Bern.
- WAITS, L., P. TABERLET, J. E. SWENSON, F. SANDEGREN, R. FRANZEN (2000): Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Mol. Ecol.* 9, 421-431.
- WANDELER, P., P. E. HOECK, L. F. KELLER (2007): Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 22, 9.
- WARD, R. H., B. L. FRAZIER, K. DEW-JAGER, S. PAABO (1991): Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8720-8724.
- WEIR, B. S. (1990): *Genetic Data Analysis*, Sinauer. Sunderland, MA. pp 124-125.
- WEISSENBACH, J., G. GYAPAY, C. DIB, A. VIGNAL, J. MORISSETTE, P. MILLASSEAU, G. VAYSSEIX, M. LATHROP (1992): A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359, 794-801.
- WERDELIN, L. (1981): The evolution of lynxes. *Ann. Zool. Fenn.* 18, 1: 37-71.
- WHITE, P.S., O. L. TATUM, H. TEGELSTRÖM, L. D. DENSMORE III (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. U: *Molecular Genetic Analysis of Populations* (Hoelzel, A. R., urednik). Oxford University Press. New York. str. 65-101.
- WILDT, D. E. (1996): Male reproduction: assessment, management, and control of fertility. U: *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques*. (Kleiman, D. G., M. E. Allen, K. V. Thompson, S. Lumpkin, urednici). University of Chicago Press. Chicago. str. 429–450.

- WILLIAMSON, J. E., R. M. HUEBINGER , J. A. SOMMER , E. E. LOUIS JR, R. C. BARBER (2002): Development and cross-species amplification of 18 microsatellite markers in the Sumatran tiger (*Panthera tigris sumatrae*). Mol. Ecol. 2(2),110-112.
- WOLSAN, M. (1993): E´volution des carnivores Quarternaires en Europe centrale dans leur contexte stratigraphique et pale´oclimatique. L' Anthropologie 7, 203–222.
- ZAGWIJN, W. H. (1992): Migration of vegetation during the Quarternary in Europe. Frankfurt, Cour. Forschungsinstitut Senckenb. 153, 9-20.
- ZHANG, D. X., G. M. HEWITT (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. Trends Ecol. Evol. 11, 247-251.

8. Sažetak

Genska raznolikost populacije risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske

Magda Sindičić dr. med. vet.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska

Euroazijski ris (*Lynx lynx*) jedan je od najugroženijih sisavaca Hrvatske, strogo je zaštićena vrsta a brojnost se procjenjuje na 40 do 60 jedinki. Nakon izumiranja početkom 20. stoljeća, populacija je ponovno uspostavljena reintrodukcijom iz Slovačke. Uz krivolov, fragmentaciju staništa i nedostatak plijena, kao jedan od najvažnijih uzroka pada brojnosti u posljednjih 10 godina smatra se gubitak genske raznolikosti, nastao kao posljedica parenja u srodstvu. Cilj ovog istraživanja bilo je utvrditi da li su osnivački učinak (razvoj populacije iz šest naseljenih jedinki) i parenje u srodstvu doveli do gubitka genske raznolikosti u tolikoj mjeri da to ugrožava opstanak populacije. Utvrđeno je da kontrolna regija mitohondrijske DNA svih analiziranih uzoraka dinarske (Hrvatska, Slovenija, Bosna i Hercegovina) i karpatske populacije (Slovačka) pripadaju istom haplotipu koji je identičan haplotipu euroazijskih risova iz baltičkih zemalja, Karpata te iz reintroducirane švicarske populacije. Kod 60 uzorka euroazijskog risa iz Hrvatske na 20 mikrosatelitskih lokusa utvrđena je prisutnost ukupno 62 alela, a srednji broj alela po lokusu je iznosio 3,1. Alelna bogatstvo risa iz Hrvatske iznosi 3,049 te efektivan broj alela iznosi 2,113. Uočena heterozigotnost (genska raznolikost) iznosi 0,435 a očekivana heterozigotnost 0,490. Značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže pronađeno je na tri lokusa. Unutar populacije risa u Hrvatskoj nije došlo do podjele na subpopulacije i potvrđena je prisutnost uskog grla. Populacija risa iz Hrvatske ima najniže vrijednosti parametara genske raznolikosti od svih do sada istraženih populacija risa, te znatno niže vrijednosti u usporedbi s autohtonom populacijom iz Karpata odakle potječe.

9. Summary

Dissertation

Genetic diversity of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Croatia

Magda Sindičić DVM

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb,
Croatia

Eurasian lynx (*Lynx lynx*) is one of the most endangered Croatian mammals, population estimated at 40 – 60 animals is strictly protected. After extinction at the beginning of the 20th century population has been established by the reintroduction from Slovakia. Besides poaching, habitat fragmentation and lack of prey, loss of genetic diversity due to inbreeding is thought to be one of the main causes of the population decline in the past 10 years. The goal of this research was to establish if founder effect (population development from six reintroduced animals) and inbreeding have caused such a severe loss of genetic diversity that it threatens the population survival. It has been confirmed that all analyzed samples from Dinaric (Croatia, Slovenia, Bosnia and Herzegovina) and Carpathian population have the same mtDNA control region haplotype, identical to the one from the Baltic states, Carpathian and reintroduced Swiss population. Totally 60 Eurasian lynx samples from Croatia had 62 alleles on 20 microsatellites, with average allele number 3,1. Allelic richness was 3,049 and effective allele number was 2,113. Observed and expected heterozygosity were 0,435 and 0,490. Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found on three loci. Subpopulations have not been identified among Croatian samples, and bottleneck has been confirmed. Croatian lynx population has the lowest genetic diversity out of all researched lynx populations, and significantly lower than autochthonous Carpathian population.

10. Životopis

Rođena sam 24. studenog 1980. godine u Zadru. Maturirala sam 1999. godine, kada upisujem studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te sam nakon redovnog pohađanja nastave, 2006. godine s prosjekom ocjena 4.50 diplomirala među 10% najboljih studenata generacije. Doktorski studij iz veterinarskih znanosti na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2009. godine.

Tijekom studiranja na Veterinarskom fakultetu bila sam demonstrator u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju te Zavodu za biologiju. Sudjelovala sam u istraživanjima velikih zvijeri pod vodstvom prof. dr. sc. Đure Hubera, u sklopu čega sam provodila terenska i laboratorijska istraživanja, te sam izradila tri studentska znanstvena rada, od kojih su dva nagrađena rektorovom i jedan dekanovom nagradom. Tijekom studija bila sam aktivni član i obnavljala nekoliko funkcija u studentskim udrugama Veterinarskog fakulteta „IVSA“ i „EQUUS“, bila sam urednik studentskog časopisa „Anamneza“, te predstavnik studenata u Fakultetskom vijeću. Pet godina sam trenirala i natjecala se u u debatnim retoričkim disciplinama.

Od srpnja 2006. do veljače 2007. bila sam zaposlena kao stručni suradnik u Oktal Pharmi d.o.o. Od travnja do prosinca 2007. bila sam zaposlena na Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao pomoćnik voditelja međunarodnog istraživačkog projekta (voditelj prof. dr. sc. Đ. Huber) „Prekogranična suradnja u upravljanju, zaštiti i istraživanju Dinarske populacije risa“, financiranog od strane Europske komisije. Od siječnja 2008. godine zaposlena sam kao znanstveni novak na znanstvenom projektu „Zdravstveni nadzor divljači“ (MZOŠ 053-0532400-2398) prof. dr. sc. Alena Slavice, na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sudjelovala sam u pripremi prijedloga projekta, te provedbi više međunarodnih istraživačkih projekata.

Autor ili koautor sam na 11 originalnih znanstvenih radova, od kojih šest indeksiranih u Current Contents bazi. Također sam jedan od autora na četiri knjige i 25 kongresnih priopćenja. Mentor sam na šest studentskih znanstvenih radova nagrađenih rektorovom nagradom.

Popis radova

Knjige

1. HUBER, Đ., Z. JAKŠIĆ, A. FRKOVIĆ, Ž. ŠTAHAN, J. KUSAK, D. MAJNARIĆ, M. GRUBEŠIĆ, B. KULIĆ, M. SINDIČIĆ, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, V. LAY, M. LJUŠTINA, D. ZEC. R. LAGINJA, I. FRANČETIĆ (2008): Plan gospodarenja središnjim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Ministarstvo regionalnog razvoja, šumarstva i vodnog gospodarstva.
2. ŠTRBENAC, A., Đ. HUBER, J. KUSAK, P. OKOVIĆ, M. SINDIČIĆ, J. JEREMIĆ, A. FRKOVIĆ, T. GOMERČIĆ (2008): Bilten „Očuvanje velikih zvijeri u Hrvatskoj“ Br.2/siječanj 2008. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
3. ŠTRBENAC, A., S. DESNICA, Đ. HUBER, J. KUSAK, J. JEREMIĆ, M. SINDIČIĆ, P. ŠTRBENAC, T. GOMERČIĆ, D. ŠARIĆ, N. SKOZA (2007): Bilten „Očuvanje velikih zvijeri u Hrvatskoj“. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
4. SINDIČIĆ, M., A. ŠTRBENAC, P. OKOVIĆ, Đ. HUBER, J. KUSAK, JOSIP; T. GOMERČIĆ, V. SLIJEPEVIĆ, I. VUKUŠIĆ, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, Ž. ŠTAHAN (2010): Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj (za razdoblje od 2010. do 2015.). Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. SLAVICA, A., D. DEŽDEK, D. KONJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ, M. SINDIČIĆ, D. STANIN, J. HABUŠ; N. TURK (2011): Prevalence of leptospiral antibodies in the red fox (*Vulpes vulpes*) population of Croatia. Veterinárni medicína 56 (4): 209-213.
2. GOMERČIĆ, T., M. SINDIČIĆ, A. GALOV, H. ARBANASIĆ, J. KUSAK, I. KOČIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, Đ. HUBER (2010): High genetic variability of grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. Zoological studies 49 (6), 816-823.
3. RADIŠIĆ, B., M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, D. VNUK, D. MATIČIĆ, A. SLAVICA (2010): Ovariectomy of a brown bear (*Ursus arctos*): a case report. Veterinárni medicína 55 (7): 353-357.
4. SLAVICA, A., D. KONJEVIĆ, Đ. HUBER, Z. MILAS, N. TURK, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, D. DEŽDEK, T. MAŠEK (2009): Serologic Evidence of *Leptospira* spp. Serovars in Brown Bears (*Ursus arctos*) from Croatia. Journal of wildlife diseases 46(1): 251-256.
5. GOMERČIĆ, T., G. GUŽVICA, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. FRKOVIĆ, D. PAVLOVIĆ, J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER (2009): Variation in teeth number, teeth and skull disorders in Eurasian lynx, *Lynx lynx* from Croatia. Folia zoologica. 58 (1): 57-65.
6. HUBER Đ., J. KUSAK, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, D. MAJNARIĆ, M. SINDIČIĆ (2008): A multidimensional approach to managing the European Brown bear in Croatia. Ursus 19(1):22-32.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. SINDIČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, TOMISLAV; A. GALOV, ANA; H. ARBANASIĆ, HAIDI; J. KUSAK, JOSIP; A. SLAVICA, ALEN; Đ. HUBER, (2011): Mitochondrial DNA control region as a tool for species identification and distinction between wolves and dogs from Croatia. Veterinarski arhiv 81(2): 249-258.
2. GOMERČIĆ, T., M. SINDIČIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, G. GUŽVICA, GORAN; A. FRKOVIĆ, D. PAVLOVIĆ, J. KUSAK, A. GALOV, Đ. HUBER (2010): Cranial morphometry of the Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) from Croatia. Veterinarski arhiv. 80 (3): 393-410.
3. SLAVICA, A., Ž. CVETNIĆ, D. KONJEVIĆ, Z. JANICKI, K. SEVERIN, KREŠIMIR; D. DEŽDEK, M. SINDIČIĆ, J. ANTIĆ (2010): Detection of *Leptospira* spp. serovars in wild boars (*Sus scrofa*) from continental part of Croatia. Veterinarski arhiv. 80 (2): 247-257.
4. SINDIČIĆ, M., N. SINANOVIĆ, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, Đ. HUBER, S. KUNOVAC, I. KOS (2010): Legal status and management of the Dinaric lynx population. Veterinaria. 58(3-4): 229-238.
5. FARKAŠ, V., T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, V. SLIJEPČEVIĆ, Đ. HUBER, A. FRKOVIĆ, S. MODRIĆ (2009): Kranimetrijska analiza i utvrđivanje spolnog dimorfizma u smeđeg medvjeda (*Ursus arctos* L.) u Hrvatskoj. Šumarski list. 9-10 (133): 527-537.

Ostali radovi u drugim časopisima

1. SINDIČIĆ, M. (2011): Radionica interventnih timova za velike zvijeri. Lovački vjesnik 120(5): 53.
2. SINDIČIĆ, M. (2011): Ambasadorica risa i ris: radionica PMFar. Lovački vjesnik 120(4): 27.
3. SINDIČIĆ, M. (2011): Jesu li medvjedi pravi hibernari? Lovački vjesnik 120(3): 32.
4. SINDIČIĆ, M., D. ZEC, Đ. HUBER (2011): Analiza šteta od smeđih medvjeda u Hrvatskoj u razdoblju od 2004. do 2009. godine. Šumarski list 1-2 (135), 63-68.
5. SINDIČIĆ, M. (2010): Balkanski ris. Nacionalni parkovi 2(11): 18-21.
6. SINDIČIĆ, M. (2010): Problem medvjede siročadi. Lovački vjesnik 119(11): 20-21.
7. SINDIČIĆ, M. (2010): Parenje u srodstvu kod divljih životinja. Lovački vjesnik 119(11): 20.
8. SINDIČIĆ, M. (2010): Međunarodna konferencija o gospodarenju divljači - Gospodarenje divljom svinjom. Lovački vjesnik 119(10): 45.
9. SINDIČIĆ, M. (2010): Prihvaćen novi Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2010.-2015. Lovački vjesnik 119(10): 51.
10. SINDIČIĆ, M. (2010): Ozbiljno ugrožena zvijer na meti krivolovaca. Lovački vjesnik 119(7-8): 33.

11. SINDIČIĆ, M. (2010): Unapređivanje gospodarenja smeđim medvjedom. Lovački vjesnik 119(7-8): 32.
12. SINDIČIĆ, M. (2010): Divlje životinje pripadaju prirodi, a ne našim domovima! Lovački vjesnik 119(5): 34.
13. SINDIČIĆ, M. (2010): Praktični primjeri i razmjena iskustva interventnih timova. Lovački vjesnik 119(5): 35.
14. SINDIČIĆ, M. (2010): Reintrodukcija iberijskog risa - Najugroženija zvijer Europe. Lovački vjesnik 119(5): 36-37.
15. SINDIČIĆ, M. (2010): Radiotelemetrijskom ogrlicom prvi puta obilježen balkanski ris. Lovački vjesnik 119(5): 37.
16. SINDIČIĆ, M. (2010): Pregled dobi odstrijeljenih medvjeda u razdoblju od 2005. do 2009. godine. Lovački vjesnik 119(4): 16-17.
17. SINDIČIĆ, M. (2010): Upravljanje ugroženim populacijama euroazijskog risa. Lovački vjesnik 119(3): 27.
18. SINDIČIĆ, M. (2009): Euroazijski ris - leopard hrvatskih šuma. Meridijani 140: 60-66.
19. SINDIČIĆ, M. (2009): Ne ostvaruje se planirani odstrjel medvjeda. Lovački vjesnik 118(10): 8-9.
20. SINDIČIĆ, M. (2009). Mnogo medvjeda uzrokuje malo šteta. Lovački vjesnik 118(9): 18-19.
21. SINDIČIĆ, M. (2009): Krivolov najvažniji uzrok pada brojnosti populacije risa. Dobra kob 95: 42-43.
22. SKRBINŠEK, T., M. SINDIČIĆ (2008): Zajednički do podataka o risu. Lovački vjesnik 117(7-8),24-25.
23. SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER (2008): Tko radi risu o glavi? Dobra kob 79:24-25.
24. SINDIČIĆ, M. (2007): Budućnost risa u Hrvatskoj. Lovački vjesnik 116(12),30-31.
25. SINDIČIĆ, M. (2007): Kako platiti, ali i smanjiti štetu od medvjeda. Lovački vjesnik 116(11),14.
26. SINDIČIĆ, M. (2006): Određivanje spola smeđeg medvjeda metodom lančane reakcije polimerazom, sažetak. Veterinar 45(1),94.
27. SINDIČIĆ, M. (2006): Utjecaj obilježja nastambe na ponašanje smeđeg medvjeda, sažetak. Veterinar 45(1),88.
28. SINDIČIĆ, M. (2003): Land of brown bears - Croatia. IVSA Journal, Congress issue 24: 6-7.
29. SINDIČIĆ, M. (2003): Plemenita periska. Veterinar 46: 5-6.
30. SUŠIĆ, G., M. SINDIČIĆ (2003): Bjeloglavi sup i njegova zaštita u Hrvatskoj. Veterinar 46: 25-29.
31. SINDIČIĆ, M. (2003): Smeđi medvjed. Veterinar 46: 47-51.
32. SINDIČIĆ, M. (2002): Utočište za mlade medvjede - Kuterevo. Meridijani 70(IX): 38-41.
33. SINDIČIĆ, M. (2001): Agresija pasa. Veterinar 45: 51-52.

Plenarna predavanja

1. SLAVICA A., K. PINTUR, D. KONJEVIĆ, N. POPOVIĆ, M. SINDIČIĆ (2008): Roe deer-vehicle collisions in Karlovac county (Croatia). Povzetki 1. slovenski posvet z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjado: srnjad, Velenje, Slovenija.

Radovi u zborniku

1. PAĐEN, L., I. SADARIĆ, T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. SLAVICA (2009): Design of species specific primers for amplification of mitochondrial DNA of Croatian wild animals. Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine June 12-13, Zagreb. Croatia. str 129-137.

Kongresna priopćenja

1. SINDIČIĆ, M (2010): Krvoločne zvijeri ili prirodno bogatstvo - utjecaj medija na stav javnosti prema velikim zvijerima. Knjiga sažetaka Znanstveno stručni skup u povodu 125. godišnjice Hrvatskog prirodoslovnog društva, Zagreb. pp 46-47.
2. SLAVICA, A., D. KONJEVIĆ, Z. JANICKI, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, D. DEŽDEK, K. PINTUR, Ž. CVETNIĆ (2010): Divlja svinja (*Sus scrofa*) kao rezervoar opasnih zaraznih bolesti. Povzetki, prispevki 2. slovenski posvet z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjadjo: divji prašič. Velenje, Slovenija. pp 47-48.
3. SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER, T. GOMERČIĆ, Z. JAKŠIĆ, A. MERTENS, A. MAJIĆ SKRBINŠEK; A. SLAVICA (2010): Brown bear damages in Croatia during the 5-year period 2004 – 2008. Program, Abstract and Information 19th International Conference on Bear Research and Management. Tbilisi, Georgia. pp 93-93
4. GEORGIADIS, L., M. SINDIČIĆ, A. KARAMANLIDIS, G. GIANNATOS, S. PLLAHA, E. TSINGARSKA, S. KUNOVAC, M. PAUNOVIC, A. STOJANOV, T. SKRBINSEK, Đ. HUBER (2010): Conservation status of brown bears in the Dinara – Pindos and Stara Planina – Rila - Rhodopi Mountains. Program, Abstract and Information 19th International Conference on Bear Research and Management. Tbilisi, Georgia. pp 97-97
5. FARKAŠ, V., T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, V. SLIJEPČEVIĆ, Đ. HUBER, A. FRKOVIĆ (2009): Craniometrical analysis and sexual dimorphism of brown bear (*Ursus arctos*, L.) in Croatia. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 192 – 193.
6. RADIŠIĆ, B., M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, D. VNUK, D. MATIČIĆ, A. SLAVICA (2009): Ovariektomija smeđe medvjedice. Zbornik sažetaka Znanstveno-stručni sastanak Veterinarska znanost i struka. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. pp 70-71.
7. DEŽDEK, D., A. VOJTA, Z. LIPEJ, A. SLAVICA, M. SINDIČIĆ, T. KEROS, R. BECK (2009): Učestalost adenovirusa CAV-2 u crvene lisice (*Vulpes vulpes*) na području Zagrebačke županije. Zbornik sažetaka Znanstveno-stručni sastanak Veterinarska znanost i struka. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. pp 36-37.
8. KOCIJAN, I., A. GALOV, H. ČETKOVIĆ, H. ARBANASIĆ, J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER (2009): Genetic characteristics of the brown bear (*Ursus arctos*) population in Croatia. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 73-74.
9. KONJEVIĆ, D., L. MANOJLOVIĆ, Z. JANICKI, K. SEVERIN, P. LAZAR, A. SLAVICA, M. SINDIČIĆ, M. MAROTTI (2009): Temporary growth arrest during the

- antler cycle in red deer (*Cervus elaphus L.*). 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 189 – 190.
10. KONJEVIĆ, D., V. NJEMIROVSKIJ, M. VUKOVIĆ, A. SLAVICA, Z. JANICKI, K. SEVERIN, M. SINDIČIĆ (2009): Variations in teeth shape, number and position in wild stone martens from Croatia – preliminary results. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 187 – 188.
 11. SINDIČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, A. GALOV, H. ARBANASIĆ, J. KUSAK, Đ. HUBER, A. SLAVICA (2009): Comparison of mitochondrial DNA of grey wolf (*Canis lupus*) and dog (*Canis lupus familiaris*) from Croatia. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 84-85.
 12. SLAVICA, A., Ž. CVETNIĆ, Ž. ČAČ, D. KONJEVIĆ, M. SINDIČIĆ, Z. JANICKI, D. DEŽDEK, K. SEVERIN (2009): Sylvatic rabies in Croatian urban environment. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 110-111.
 13. SPAJIC, T., J. KUSAK, V. SLIJEPČEVIĆ, M. SINDIČIĆ, T. GOMERČIĆ, Đ. HUBER (2009): Determination of deer body condition based on bone marrow fat content. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 190-191.
 14. SLIJEPČEVIĆ, V., T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, J. KUSAK, Đ. HUBER (2009): Telemetry study of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Croatia. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 188-189.
 15. KOCIJAN, I., A. GALOV, H. ARBANASIĆ, H. ČETKOVIĆ, T. SKRBINŠEK, J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, M. VOETEN, Đ. HUBER (2008): Molekularno-biološke metode u istraživanjima populacije smeđih medvjeda (*Ursus arctos*). Zbornik sažetaka znanstvenog simpozija 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, Zagreb, Hrvatska. p 82.
 16. SINANOVIC, N., M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER (2008): Status i perspektiva euroazijskog risa (*Lynx lynx*) u Bosni i Hercegovini. Knjiga kratkih sadržaja Šesti Simpozij poljoprivrede, veterinarstva, šumarstva i biotehnologije, Goražde, Bosna i Hercegovina. pp 29-30.
 17. MAJIĆ SKRBINŠEK, A., M. SINDIČIĆ, I. KOS, Đ. HUBER (2008): Importance of lynx (*Lynx lynx*) attacks to livestock as perceived by inhabitants of lynx areas in Slovenia and Croatia. Book of abstracts of the 8th conference of the EWDA, Rovinj, Croatia. pp 70 – 71.
 18. SINDIČIĆ, M., A. FRKOVIĆ, D. HUBER, T. GOMERČIĆ, J. KUSAK (2008): Mortality of reintroduced Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Croatia. Book of abstracts of the 8th conference of the EWDA, Rovinj, Croatia. p 87.
 19. MAJIĆ SKRBINŠEK, A., SINDIČIĆ M., KROFEL M., SKRBINŠEK T., SLIJEPČEVIĆ V., POTOČNIK H., KUSAK J., GOMERČIĆ T., KOS J., HUBER Đ. (2008): DinaRis: A Project in Support of Transboundary Cooperation in Lynx Conservation. PanEuropean conference on population level management of European large carnivores. Postojna Slovenija. p3.
 20. SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, V. SLIJEPČEVIĆ, T. SKRBINŠEK, H. POTOČNIK (2007): Razvoj zamki za prikupljanje uzoraka dlaka risa (*Lynx lynx*). Zbornik sažetaka "Veterinarska znanost i struka". Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. p 19.
 21. GOMERČIĆ, T., G. GUŽVICA, V. SLIJEPČEVIĆ, Đ. HUBER, J. KUSAK, M. ĐURAS GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ (2007): Upotreba GPS ogrlice za praćenje risa u Hrvatskoj. Zbornik sažetaka "Veterinarska znanost i struka". Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. p 13.

22. SLAVICA A., M. GRUBEŠIĆ, K. KRAPINEC, D. KONJEVIĆ, A. SUŠNIK, M. SINDIČIĆ, N. POPOVIĆ, N. ROŠTAN (2007): Status of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) subpopulation in Klana region, Delnice – central Croatia. U Book of Abstracts of 2nd International Symposium "Game and Ecology". Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb. p 43.
23. SINDIČIĆ M., Đ. HUBER, T. GOMERČIĆ, J. KUSAK (2007): Management and research of the Croatian lynx population. U Book of Abstracts of 2nd International Symposium "Game and Ecology". Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb. p 35.
24. GOMERČIĆ T., G. GUŽVICA, M. ĐURAS GOMERČIĆ, A. FRKOVIĆ, D. PAVLOVIĆ, J. KUSAK, Đ. HUBER, M. SINDIČIĆ (2007): Is recent reintroduced lynx larger than the extinct, autochthonous one? U Book of Abstracts of 2nd International Symposium "Game and Ecology". Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb. p 31.
25. HUBER Đ., J. KUSAK, M. SINDIČIĆ (2007): Bear Emergency Team in Croatia. Proceedings of International Symposium Large Carnivores and Agriculture - Comparing Experiences across Italy and Europe, Assisi, Italy. pp 21-22.

Neobjavljena sudjelovanja na skupovima

1. KARAMANLIDIS, A., M. DE BARBA, S. FILACORDA, L. GEORGIADIS, C. GROFF, I. KOCIJAN, L. KRUCKENHAUSER, G. RAUER, M. SINDIČIĆ, T. SKRBINŠEK, P. STRAKA, PAULE; M. JELENČIĆ, Đ. HUBER (2010): Bringing together genetic research on brown bears in the Alps – Dinara – Pindos and Carpathian Mountains. 19th International Conference on Bear Research and Management, Tbilisi, Georgia.
2. SINDIČIĆ, M., Đ. HUBER, A. MAJIĆ SKRBINŠEK, T. GOMERČIĆ, J. KUSAK (2008): Large carnivore management plans for the Republic Croatia. PanEuropean conference on population level management of European large carnivores. Postojna Slovenija.
3. HUBER Đ., J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, T. GOMERČIĆ (2008): Bear friendly products as a tool for public acceptance. Proceedings of International Symposium "Of bears, wolves and men: European initiatives for coexistence and development", Luchon, France.
4. HUBER Đ., J. KUSAK, M. SINDIČIĆ, T. GOMERČIĆ (2008): Bear Emergency Team in Croatia. Proceedings of International Symposium "Of bears, wolves and men: European initiatives for coexistence and development", Luchon, France.

Studentski radovi

1. SINDIČIĆ, M. (2005): Određivanje spola smeđeg medvjeda metodom lančane reakcije polimerazom. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
2. SINDIČIĆ, M. (2004): Utjecaj nastambe na aktivnost smeđih medvjeda. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
3. SINDIČIĆ, M. (2003): Ponašanje mladih medvjeda u Utočištu u Kuterevu. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Radovi za napredovanja

1. SINDIČIĆ, M. (2006): Provođenje plana gospodarenja smeđim medvjedom u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Druge vrste radova

1. KARAMANLIDIS, A.A., M. DE BARBA, L. GEORGIADIS, C. GROFF, M. JELINČIĆ, I. KOCIJAN, L. KRUCKENHAUSER, G. RAUER, M. SINDIČIĆ, T. SKRBINŠEK, Đ. HUBER (2009): Common guidelines for the genetic study of brown bears (*Ursus arctos*) in southeastern Europe. Athens, September 2009. Published by the Large Carnivore Initiative for Europe.
2. MAJIĆ SKRBINŠEK, A., T. SKRBINŠEK, M. SINDIČIĆ, M. KROFEL, Đ. HUBER, J. KUSAK, H. POTOČNIK, I. KOS (2008): Proposal for common lynx management strategy for Slovenia and Croatia.
3. MAJIĆ SKRBINŠEK, A., M. SINDIČIĆ, M. KROFEL, H. POTOČNIK, T. SKRBINŠEK (2007): Brošura "Ris". DinaRis projekt, Zagreb.
4. ŠTRBENAC, A., J. JEREMIĆ, M. SINDIČIĆ, Đ. HUBER, M. ČUŽE (2007): Letak "Divlje životinje pripadaju prirodi, a ne našim domovima". Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
5. HUBER, Đ., M. SINDIČIĆ (2005): Letak "Smeće ubija medvjede". LIFE COEX projekt.
6. HUBER, Đ., A. MAJIĆ SKRBINŠEK, M. SINDIČIĆ (2005): Letak "Ekoturizam". LIFE COEX projekt.
7. HUBER, Đ., M. SINDIČIĆ (2005): Letak "Medvjedu prijateljski proizvodi". LIFE COEX projekt.
8. HUBER, Đ., A. MAJIĆ SKRBINŠEK, M. SINDIČIĆ (2005): Letak "Medvjedi i otpad". LIFE COEX projekt.
9. HUBER, Đ., A. MAJIĆ SKRBINŠEK, M. SINDIČIĆ (2005) : Letak "Praćenje smrtnosti medvjeda". LIFE COEX projekt.